



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Maëlle CARTEL

Le 31 octobre 2019

**Fonctions et régulations de la kinase CHK1 dans l'hématopoïèse
normale et leucémique**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :
CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Stéphane MANENTI et Christine DIDIER

Jury

M. Gustavo GUTIERREZ GONZALEZ, Rapporteur
Mme Brigitte SOLA, Rapporteur
Mme Françoise PORTEU, Examinatrice
M. Bernard PAYRASTRE, Examineur
M. Stéphane MANENTI, Directeur de thèse
Mme Christine DIDIER, Co-directrice de thèse

Résumé

La protéine Checkpoint kinase 1 (CHK1) est un acteur clé du cycle cellulaire qui agit comme un agent double, à la fois dans un contexte cellulaire normal mais également en condition de stress tel que l'apparition de dommages à l'ADN. Ma thèse a consisté à évaluer les fonctions et la régulation de cette protéine dans ces deux contextes, en m'intéressant à l'hématopoïèse normale et leucémique. Plusieurs études mettent déjà en avant un rôle de CHK1 dans l'hématopoïèse normale, mais une meilleure compréhension de l'importance de CHK1 dans la différenciation, notamment dans la voie mégacaryocytaire, est nécessaire. De plus, CHK1 se révèle importante dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM), notamment dans la résistance à la chimiothérapie. Pour permettre une meilleure compréhension de la biologie des LAM et déterminer comment cibler CHK1, il est aujourd'hui nécessaire de définir comment cette kinase est régulée dans cette pathologie. Ces deux axes, ont constitué mon travail de thèse, dont les objectifs ont été de mieux définir les fonctions de la kinase CHK1 dans ces deux contextes cellulaires. Ainsi, ce travail met en lumière le rôle de CHK1 dans la différenciation mégacaryocytaire normale, possiblement en régulant l'activité du facteur de transcription NF-E2. De plus, dans le contexte des Leucémies Aiguës Myéloïdes, ce travail implique la déubiquitineuse USP7 comme régulateur majeur du niveau protéique de CHK1 dans les LAM, et comme nouvelle cible thérapeutique d'intérêt dans cette pathologie.

Mots clés : Checkpoint kinase 1, Leucémies Aiguës Myéloïdes, USP7, différenciation mégacaryocytaire, NF-E2.

Summary

The protein Checkpoint kinase 1 (CHK1) acts as a double agent. Indeed, CHK1 is a key player in the cell cycle, both in a normal cellular context and stress conditions such as DNA damage. The goal of my PhD project was to evaluate the functions and regulation of this protein in these two contexts, working on normal and leukemic hematopoiesis. Several studies have already described a role of CHK1 in normal hematopoiesis, but the mechanisms behind the importance of CHK1 in differentiation, particularly in megakaryopoiesis, remain to be elucidated. In addition, CHK1 has proven to be important in Acute Myeloid Leukemia (AML), particularly in the context of resistance to chemotherapy. To better understand the biology of AML, and identify ways to target CHK1, it is necessary to decipher how this kinase is regulated in this context. These two axes have been the backbone of my thesis work, which aims to better define the CHK1 kinase role in these two cellular contexts. It highlights a role for CHK1 in normal megakaryopoiesis, possibly by regulating the activity of the NF-E2 transcription factor. In addition, in the context of Acute Myeloid Leukemia, this work identifies the USP7 deubiquitynase as a major regulator of CHK1 protein levels in AML, and as a new interesting therapeutic target in this pathology.

Keywords : Checkpoint kinase 1, Acute Myeloid Leukemia, USP7, megakaryocyte differentiation, NF-E2.

Remerciements

La thèse ressemble à une véritable aventure, avec de nombreux obstacles, mais aussi de belles découvertes !

Tout ce travail a été possible grâce à la présence et au soutien de nombreuses personnes, qui m'ont justement aidé à passer cette aventure, et que je tiens à remercier ici...

Tout d'abord, je souhaite remercier chaleureusement le Dr Brigitte SOLA, le Pr Gustavo GUTIERREZ GONZALEZ, le Pr Françoise PORTEU ainsi que le Pr Bernard PAYRASTRE pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse, ainsi que pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation et à la discussion de mes travaux.

*Merci à **Stéphane**, mon directeur de thèse, qui m'a accueilli dans l'équipe dès mon stage de master 2 et qui m'a accordé sa confiance pour me permettre de mener ce projet de thèse comme je le souhaitais, et me laisser ainsi la liberté de travailler en autonomie. Merci pour l'aide et les discussions, tant scientifiques que personnelles.*

*Un immense merci à **Christine**, ma co-directrice de thèse, pour m'avoir épaulée au quotidien tout au long de ces années. Un immense merci n'est même pas suffisant ... Je suis ravie d'avoir pu travailler à tes côtés car, outre ton appui scientifique, ta gentillesse, ton optimisme inébranlable et ta bonne humeur quotidienne m'ont beaucoup aidé tout au long de ces années !*

*Merci à l'ensemble des membres de l'équipe 8 ! **Alex**, mon voisin de bureau au soutien sans faille - **Charly**, le dernier thésard de l'équipe (tu vas tout déchirer !!), avec sa gentillesse et sa bienveillance sans égard - **Gaby**, collègue de bureau, collègue de Nœuds-Nœuds et prof de couture ! - **Camille H.**, devenue bien plus que ma stagiaire notamment grâce aux nombreuses heures passées au microscope ! - Et bien sûr **Carine**, **Sylvie**, **Laurent** et **Domenico** pour les échanges au quotidien.*

*Merci à **Sonia**, **Bastien**, **Vincent**, **Marie-Jeanne** et **Marina** et l'ensemble de l'équipe 18 pour les collaborations ou discussions que nous avons eu sur ces différents projets de thèse, me permettant toujours d'en apprendre plus !*

*Merci à tous les amis que j'ai rencontré pendant ces années de thèse : **Camille F.**, **Renaud**, **Justine**, **Mathilde**, **Isa**, **Pierre**, **Laure**, **Mattias**, **Gaby**, **Christophe**, **Charly**, **Camille A.**, **Alex**, **Charlène**, **Camille H.**, **Patrícia**, **Ines**, **Alison**... Entre les soirées jeux, les barbeuc' et les karaokés, qu'est ce qu'on a profité !! J'ai la tête pleine de beaux souvenirs !!*

Enfin, au-delà de mes collègues et amis du laboratoire, il y a bien évidemment tous mes proches...

Un énorme merci à **mes parents**, toujours présents, disponibles, jamais avares de soutien et d'encouragements ! Merci d'avoir essayé de comprendre du mieux possible CHK1, et surtout, merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir tout fait pour que j'en arrive là aujourd'hui.

Merci à **ma sœur**, grâce à qui le temps passé dans les bouchons semblait toujours moins long...

Merci aux copains de plus longue date sans qui rien ne serait pareil, **Claire, Valentin, Juliette, Hadjer, Anaïs et Alex**.

Romain... un merci n'est pas suffisant ... d'abord, merci d'avoir eu cette idée de venir à Toulouse (malgré tout !), parce que c'est sûr que sans toi, l'histoire aurait été différente ! Mille merci pour m'avoir soutenu, aidé et supporté (c'est fou comme les résultats d'une manip ou des petites souris peuvent changer la face du monde ... !) à chaque étape de ce parcours ! Merci de m'avoir écouté répéter (répéter et encore répéter) mes présentations, et pour ton effort de compréhension dans le but de me poser des questions. Et surtout, merci pour tout ce temps passé ensemble !

Il est important de dire que sans financement, rien n'aurait été possible. Je tiens donc très sincèrement à remercier La Ligue Contre Le Cancer et leurs donateurs qui m'ont permis de pouvoir effectuer le travail que je rêvais de faire pendant ces 3 années !

Et pour finir, merci à tous ceux que j'ai croisé et qui m'ont aidé de près ou de loin au cours de cette thèse.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	10
INTRODUCTION.....	12
PARTIE 1 : CHK1 DANS LE CYCLE CELLULAIRE ET LES CANCERS.....	12
I. LE CYCLE CELLULAIRE	12
1. <u>LES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE</u>	12
2. <u>LES POINTS DE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE</u>	13
2.1. Les Cyclin-Dependent Kinases (CDK) régulatrices du cycle cellulaire	13
2.2. Contrôle d'un cycle cellulaire normal	15
2.3. Contrôle d'un cycle cellulaire avec dommages de l'ADN.....	15
II. LA PROTEINE CHECKPOINT KINASE 1.....	17
1. <u>DECOUVERTE DE CHK1</u>	17
2. <u>MISE EN EVIDENCE DES PREMIERES FONCTIONS DE CHK1</u>	17
3. <u>STRUCTURE DE CHK1</u>	18
4. <u>L'ACTIVATION DE CHK1</u>	19
4.1. L'activation classique de CHK1 par phosphorylations.....	19
4.2. Modèle d'activation conventionnelle de CHK1 par modification conformationnelle	20
4.3. La levée du point de contrôle : fin d'activation de CHK1	21
4.4. Autres régulations de l'activité de CHK1	21
a. Régulation de l'activité par phosphorylation.....	21
b. Régulation de l'activité par déubiquitylation	23
5. <u>LA REGULATION DU NIVEAU DE CHK1</u>	23
5.1. Régulation transcriptionnelle.....	23
5.2. Régulation traductionnelle	25
5.3. Régulation de la stabilité de CHK1	25
a. Par ubiquitylation	25
b. Par déubiquitylation.....	26
c. Par autophagie.....	27
6. <u>Régulation de la localisation</u>	27
7. <u>ROLES DE CHK1 DANS LA REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE</u>	28
7.1. Le point de contrôle à la transition G1/S.....	28
7.2. Le point de contrôle intra S : régulation de la réplication.....	29
a. La régulation de la phase S lors de dommages à l'ADN	29
b. La régulation de la phase S lors d'un cycle cellulaire non perturbé	30
7.3. Le point de contrôle G2/M	31
7.4. Contrôle de la mitose	33
a. Contrôle de l'entrée en mitose.....	33
b. Contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique	33
8. <u>AUTRES ROLES DE CHK1</u>	35
8.1. Rôle dans l'apoptose	35
8.2. Rôle transcriptionnel.....	35

III. ROLES DE CHK1 DANS LA TUMORIGENESE ET LES CANCERS	37
1. <u>DEREGULATIONS DE CHK1 DANS LES CANCERS ET SON IMPLICATION</u>	37
1.1. <i>Un faible niveau de CHK1</i>	37
1.2. <i>Un fort niveau de CHK1</i>	38
2. <u>INTERET DU CIBLAGE DE CHK1 DANS LES CANCERS</u>	39
3. <u>UTILISATION D'INHIBITEUR DE CHK1</u>	40
a. CHK1 en monothérapie	40
b. En association avec de la chimiothérapie	41
 PARTIE 2 : ROLE DE CHK1 DANS L'HEMATOPOÏESE NORMALE ET LEUCEMIQUE	43
I. L'HEMATOPOÏESE NORMALE	43
1. <u>DEFINITION ET GENERALITES</u>	43
2. <u>DEROULEMENT DE L'HEMATOPOÏESE</u>	43
3. <u>REGULATION DE L'HEMATOPOÏESE</u>	45
II. L'IMPORTANCE DE CHK1 DANS L'HEMATOPOÏESE NORMALE	46
III. LA DIFFERENCIATION MEGACARYOCITAIRE	49
1. <u>GENERALITES</u>	49
2. <u>LES ETAPES DE LA MEGACARYOCYTOPOÏESE</u>	49
2.1. <i>Maturation nucléaire</i>	50
2.2. <i>Maturation cytoplasmique</i>	51
2.3. <i>Formation des proplaquettes et plaquettes</i>	51
2.4. <i>Les marqueurs de surface au cours de la mégacaryocytopoïèse</i>	52
3. <u>INDUCTION DE LA DIFFERENCIATION PAR LA TPO</u>	52
4. <u>REGULATION DE LA DIFFERENCIATION MEGACARYOCYTAIRE PAR DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION</u>	54
5. <u>LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF-E2</u>	55
5.1. <i>Description</i>	55
5.2. <i>Rôles</i>	55
5.3. <i>Régulation de NF-E2</i>	56
IV. LES LEUCEMIES AIGÜES MYELOÏDES.....	57
1. <u>HEMATOPOÏESE LEUCEMIQUE</u>	57
2. <u>ÉPIDEMIOLOGIE DES LAM</u>	57
2.1. <i>Présentation clinique des LAM</i>	58
2.2. <i>Cytologie des LAM</i>	58
2.3. <i>Les mutations impliquées dans les LAM</i>	60
2.4. <i>Les traitements des LAM</i>	61
V. CIBLAGE DE CHK1 DANS LES LAM.....	63
1. <u>INHIBITEURS DE CHK1 EN MONOTHERAPIE DANS LES LEUCEMIES</u>	64
2. <u>INHIBITEURS DE CHK1 EN COMBINAISON AVEC UN AGENT GENOTOXIQUE DANS LES LAM</u>	64
3. <u>CHK1, UN NOUVEAU MARQUEUR PRONOSTIC ET CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LES LAM</u>	65
 PARTIE 3 : LA DEUBIQUITYLASE USP7, REGULATEUR DE L'HOMÉOSTASIE ET DES CANCERS	67
I. VOIE DE DEGRADATION UBIQUITINE-DEUBIQUITINE	67
1. <u>L'UBIQUITYLATION DES PROTEINES</u>	67
1.1. <i>Le système Ubiquitine-Protéasome</i>	67
1.2. <i>L'ubiquitine</i>	68
a. <i>La mono-ubiquitylation</i>	69

b.	La poly-ubiquitylation.....	69
2.	<u>LA DEUBIQUITYLATION</u>	70
2.1.	Généralités	70
2.2.	Les Ubiquitin-Specific Proteases, USP	72
a.	Description	72
b.	Rôles des USP	72
II.	LA PROTEINE UBIQUITIN SPECIFIC PEPTIDASE 7	74
1.	<u>DECOUVERTE</u>	75
2.	<u>STRUCTURE D'USP7</u>	75
2.1.	Description.....	75
2.2.	Structure.....	76
3.	<u>REGULATIONS D'USP7</u>	77
3.1.	Régulation transcriptionnelle.....	77
3.2.	Régulation traductionnelle	78
3.3.	Régulation post traductionnelle	79
3.4.	Localisation.....	80
3.5.	Activité.....	81
4.	<u>ROLES D'USP7</u>	83
4.1.	Régulation de la réponse des dommages à l'ADN par USP7.....	85
a.	USP7 et l'axe p53/MDM2.....	85
b.	USP7 et l'axe CHK1	86
c.	Réponse aux dommages de l'ADN par la déubiquitylation des histones	88
d.	Tolérance des dommages à l'ADN.....	88
4.2.	Modifications épigénétiques et remodelage de la chromatine	88
a.	USP7 : régulateur de la méthylation des histones.....	89
b.	USP7 : régulateur de l'ubiquitylation des histones.....	90
4.3.	Rôle d'USP7 dans la réplication de l'ADN.....	91
4.4.	Contrôle du cycle cellulaire	94
5.	<u>USP7 ET CANCERS</u>	98
5.1.	Stabilisation d'onco-protéines	99
5.2.	Exclusion nucléaire de suppresseur de tumeurs.....	101
5.3.	Modulation des voies oncogéniques.....	101
6.	<u>INHIBITEURS D'USP7</u>	102
III.	USP7 ET TUMEURS HEMATOPOÏÉTIQUES.....	104
1.	<u>MUTATIONS D'USP7 DANS LES LAL T</u>	105
2.	<u>EXPRESSION D'USP7 DANS LES TUMEURS HEMATOPOÏÉTIQUES</u>	106
	RESULTATS	108
	PARTIE 1 : USP7, NOUVEAU REGULATEUR DE CHK1 DANS LES LAM, ET ACTEUR DE LA CHIMIORESISTANCE	108
I.	CONTEXTE SCIENTIFIQUE	108
II.	MATERIELS ET METHODES	110
1.	<u>MODELE CELLULAIRE</u>	110
2.	<u>MESURE DU POTENTIEL CLONOGENIQUE DES CELLULES PRIMAIRES DE PATIENTS ATTEINTS DE LAM</u>	110
3.	<u>XENOGREFFES DE SOURIS NOD SCID GAMMA (NSG)</u>	110
4.	<u>ANALYSE PAR SINGLE-CELL</u>	111
III.	RESULTATS.....	113
IV.	DISCUSSION	135

PARTIE 2 : ROLE ET REGULATION DE CHK1 AU COURS DE LA MITOSE	140
I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE	141
II. MANUSCRIT	142
III. DISCUSSION	163
 PARTIE 3 : ROLE DE CHK1 DANS LA DIFFERENCIATION MEGACARYOCYTAIRE	 167
I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET RESULTATS PRELIMINAIRES	167
II. MATERIELS ET METHODES	172
1. <u>MODELE CELLULAIRE DE DIFFERENCIATION MEGACARYOCYTAIRE</u>	172
2. <u>EVALUATION DE LA DIFFERENCIATION MEGACARYOCYTAIRE</u>	172
3. <u>SOURIS HETEROZYGOTES POUR CHK1</u>	172
4. <u>TRANSPLANTATION DES SOURIS</u>	172
III. RESULTATS.....	173
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVE	189
 DISCUSSION GENERALE	 195
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 198
ANNEXES.....	223

Liste des abréviations

53BP1 : p53 binding protein 1
 ADN : Acide désoxyribonucléique
 APC/C : Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
 AraC : Aracytine/cytarabine
 ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
 ATR : ATM and Rad3 Related
 ATRIP : ATR interacting Protein
 BRCA1/2 : breast cancer gene 1 and 2
 BUBR1 : Bub1(related kinase
 CDC20 : Cell Division Cycle protein 20
 CDC25 : Cell Division Cycle protein 25
 CDK : Cyclin-Dependent Kinase
 CFU : Colony forming Unit
 CHK1 : Checkpoint kinase 1
 CKI : cyclin-dependant kinase inhibitor
 CLP : Progéniteur Lymphoïde commun
 CMP : Progéniteur Myéloïde commun
 CRM1 : Chromosomal maintenance 1
 CSH : cellule souche hématopoïétique
 CSL : cellule souche leucémique
 Cul : Cullin
 DDB1 : DNA-Binding Protein 1
 DMS : système de démarcation des membranes
 DNMT3 : DNA méthyltransférase 3 alpha
 E4F1 : Viral E4 and E1A transcription factor
 EBNA1 : Epstein-Barr nuclear antigen 1
 EPO : Erythropoïétine
 ERG : ETS-related gene
 ERK : Extracellular regulated kinase
 FANC : Fanconi anemia complementation
 Fbx6 : F-box protein 6
 Fli1 : Friend leukemia integration 1
 FoxO4 – O6 : Forkhead box O4 – O6
 GATA : globin transcription factor
 GMP : progéniteur myélomonocytaire
 GMPS : guanosine 5'-monophosphate synthetase
 HSC : cellules souches hématopoïétiques
 HSV : virus Herpes Simplex

IMS : système de membranes invaginées
 JAK2 : Janus kinase 2
 KA1 : kinase associated domaine 1
 LAM : Leucémies Aiguës Myéloïdes
 LANA : protéine de Kaposi's sarcoma associated herpesvirus
 MEP : Progéniteur érythrocytaire et mégacaryocytaire
 mTor : mammalian target of rapamycin
 NES : nuclear export signal
 NF-E2 : Nuclear factor erythroid 2
 NLS : nuclear localisation signal
 PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
 Pim : Proviral Insertion in moloney murine leukemia
 PHF8 : PHD Finger Protein 8
 PMA : phorbol myristate acetate
 PP2 : serine/threonine protein phosphatase 2
 PTEN : phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10
 Rb : Retinoblastoma protein
 RPA : Replication Protein A
 RUNX1 : Runt-related transcription factor 1
 SAC : spindle assembly checkpoint
 SCF : Stem cell factor
 SH2 : Src Homology domain 2
 STAT : Signal transducer and activator of transcription
 TLK : tousel-like kinase
 TLX1 : T cell leukemia homeobox protein-1
 TP53 : tumor protein p53
 TPO : thrombopoïétine
 TNF : tumour necrosis factor
 TRAF : TNF receptor associated factor
 UPS : Système Ubiquitine Protéasome
 USP : Ubiquitin-Specific Protease
 USP7/HAUSP : Ubiquitin Specific Peptidase 7 / Herpes-Associated Ubiquitin-Specific Protease

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des phases du cycle cellulaire.....	12
Figure 2 : Rôles des complexes CDK-cyclines dans le cycle cellulaire.....	14
Figure 3 : Les composants de la réponse aux dommages à l'ADN.....	16
Figure 4 : Structure de la protéine CHK1 humaine et présentation de ses sites de phosphorylation.....	18
Figure 5 : Représentation schématique des formes tronquées de CHK1 par SPRTN	19
Figure 6 : Modèle d'activation de CHK1 en réponse à des dommages de l'ADN.....	20
Figure 7 : Modèle d'activation de CHK1 par phosphorylation et changement conformationnel.....	21
Figure 8 : Représentation schématique des régulations transcriptionnelles de CHK1	24
Figure 9 : La réparation des dommages à l'ADN médiée par CHK1	30
Figure 10 : Représentation schématique des différents mécanismes de régulation de l'interphase par CHK1	33
Figure 11 : Résumé des fonctions de CHK1 dans un cycle cellulaire perturbé ou non, avec ses cibles associées.....	36
Figure 12 : Expression de CHK1 dans les cancers.....	39
Figure 13 : La hiérarchie hématopoïétique.....	44
Figure 14 : Modèle hématopoïétique de la différenciation des mégacaryocytes.....	45
Figure 15 : Représentation schématique des facteurs de transcription requis pour l'hématopoïèse.....	46
Figure 16 : Représentation schématique de l'importance de CHK1 à différentes étapes de l'hématopoïèse.....	48
Figure 17 : Représentation schématique de la différenciation mégacaryocytaire et de la production des plaquettes.....	50
Figure 18 : Représentation schématique des clusters de différenciation exprimés au cours de la différenciation mégacaryocytaire.....	52
Figure 19 : La signalisation induite par la thrombopoïétine (TPO).....	53
Figure 20 : Structure de NF-E2 avec ses domaines p45 et p18.....	55
Figure 21 : Illustration des 8 catégories de gènes mutés de manière récurrente dans les LAM.....	61
Figure 22 : Expression de CHK1 dans les LAM.....	66
Figure 23 : Le système ubiquitine-protéasome.....	67
Figure 24 : Alignement des séquences de l'ubiquitine humaine et de la levure.....	68
Figure 25 : Représentation schématique du système ubiquitylation-déubiquitylation.....	70
Figure 26 : Représentation des différentes classes de déubiquitylases humaines.....	71
Figure 27 : Rôle des USP au cours du cycle cellulaire.....	73
Figure 28 : Représentation de la spécificité des lysines préférentiellement clivées par USP7.....	74
Figure 29 : Structure d'USP7 et ses différents domaines.....	75
Figure 30 : Représentation schématique et structurelle d'USP7.....	75

Figure 31 : Régulation transcriptionnelle de USP7.....	77
Figure 32 : Représentation schématique de la régulation par modifications post-traductionnelles de USP7.....	79
Figure 33 : Modèle de régulation de la conformation d'USP7 inactive et active.....	81
Figure 34 : Partenaires d'USP7 impliqués dans l'homéostasie ou l'oncogénèse.....	83
Figure 35 : Représentation schématique du rôle d'USP7 dans l'axe MDM2/p53.....	85
Figure 36 : Modèle de régulation et de radiorésistance dans les cellules de cancer du sein impliquant USP7.....	86
Figure 37 : Régulation de RNF168 par USP7.....	87
Figure 38 : Régulation de l'E3 ligase UHRF1 et de la méthyltransférase DNMT1 par USP7.....	89
Figure 39 : Régulation du complexe PRC1 par USP7.....	90
Figure 40 : Rôle d'USP7 au site de réplication de l'ADN.....	92
Figure 41 : Rôle d'USP7 au cours de la mitose.....	95
Figure 42 : Niveau d'expression de l'ARN d'USP7 dans plusieurs types de cancers.....	97
Figure 43 : Profile d'inhibition d'USP7 par le P22077 et le HBX41.....	103
Figure 44 : Représentation schématique des mutations décrites d'USP7.....	105
Figure 45 : Principe de la technique d'analyse de cellule unique par 10xGenomics.....	111
Figure 46 : Les niveaux protéiques de CHK1 et USP7 sont corrélés dans les lignées cellulaires et les échantillons primaires de LAM.....	113
Figure 47 : USP7 et CHK1 interagissent dans les lignées cellulaires leucémiques.....	115
Figure 48 : Etude du site d'interaction d'USP7 avec CHK1.....	116
Figure 49 : USP7 débiquityle CHK1 dans les cellules leucémiques.....	117
Figure 50 : Niveau de transcrit par million des Ubiquitine Specific Protease 7, 10 et 47 dans les lignées leucémiques HL-60 et HEL.....	118
Figure 51 : USP7 régule le niveau protéique de CHK1 dans les lignées cellulaires de LAM.....	120
Figure 52 : L'inhibition d'USP7 impacte le niveau protéique de CHK1 cytoplasmique et nucléaire.....	121
Figure 53 : L'inhibition ou l'invalidation d'USP7 induit l'apoptose et bloque le cycle des cellules de lignées leucémiques.....	122
Figure 54 : L'inhibition d'USP7 ne stimule pas la différenciation des lignées leucémiques.....	124
Figure 55 : L'inhibition d'USP7 permet une réduction tumorale <i>in vivo</i> et prolonge la survie des souris, sans toxicité pour les cellules normales.....	126
Figure 56 : L'inhibition d'USP7 <i>in vivo</i> ne modifie pas la différenciation des blastes.....	128
Figure 57 : L'inhibiteur d'USP7 agit de manière synergique avec l'AraC pour induire la mort des cellules leucémiques.....	129
Figure 58 : Un traitement au P22077 potentialise les effets de l'AraC sur les lignées cellulaires et les cellulaires primaires leucémiques <i>via</i> la perturbation de l'axe USP7/CHK1.....	131
Figure 59 : Analyse transcriptomique de la signature d'USP7 dans les LAM.....	133

Figure 60 : CHK1 est impliquée dans la différenciation mégacaryocytaire, analysée à l'aide de lignées modèles leucémiques HEL et de progéniteurs mégacaryocytaires murins	167
Figure 61 : CHK1 est phosphorylée précocement sur le résidu sérine 280 au cours de la différenciation mégacaryocytaire par les kinases PIM et RSK.....	168
Figure 62 : Etude de l'impact de l'haploinsuffisance de CHK1 chez des souris jeunes.....	172
Figure 63 : Etude de l'impact de l'haploinsuffisance de CHK1 chez des souris âgées.....	174
Figure 64 : Analyse des compartiments hématopoïétiques des souris donneuses avant transplantation.....	176
Figure 65 : Analyse des compartiments hématopoïétiques des souris 2 mois après transplantation.....	178
Figure 66 : Étude de l'interaction entre la protéine CHK1 et le facteur de transcription NF-E2.....	179
Figure 67 : Etude par phospho-protéomique des sites de phosphorylations par CHK1 sur la séquence NF-E2..	180
Figure 68 : Liste des sites de NF-E2 identifiés actuellement pour présenter des modifications post-traductionnelles.....	180
Figure 69 : Etude de l'impact de l'inactivation de CHK1 sur NF-E2.....	182
Figure 70 : Étude de l'activité transcriptionnelle de NF-E2 lors de l'inactivation pharmacologique ou pas shARN de CHK1 dans les cellules HEL.....	184
Figure 71 : Étude de l'expression des cibles transcriptionnelles de NF-E2 dans les progéniteurs murins purifiés à partir de souris sauvages ou hétérozygotes pour CHK1.....	186
Figure 72 : Niveau d'expression de CHK1 dans les progéniteurs purifiés et les mégacaryocytes murins.....	190
Figure 73 : Modèle proposé de la voie de signalisation impliquant CHK1 dans la différenciation mégacaryocytaire.....	192
Figure 74 : Modèle des rôles associés de CHK1, USP7 et PLK1 dans la mitose.....	194

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des inhibiteurs de CHK1 et leurs IC50 pour cibler CHK1 et CHK2.....	40
Tableau 2 : Liste des inhibiteurs actuellement en essai clinique en monothérapie.....	40
Tableau 3 : Liste des inhibiteurs actuellement en essai clinique en combinaison avec de la chimiothérapie.....	41
Tableau 4 : Classification FAB des LAM.....	59
Tableau 5 : Classification OMS des LAM 2016.....	60
Tableau 6 : Bilan des thérapies ciblées en cours de développement dans les LAM	63
Tableau 7 : Présentation de USP impliquées dans la régulation de l'ubiquitination des histones.....	72
Tableau 8 : Présentation de USP impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	72
Tableau 9 : Résultats de la purification par affinité couplée à une spectrométrie de masse pour USP7-FLAG...	96
Tableau 10 : Liste des cancers impliquant USP7.....	98

Introduction

Pour aider à la compréhension des résultats scientifiques obtenus au cours de ma thèse, l'introduction abordera dans un premier temps la place et la fonction de la kinase CHK1 dans le cycle cellulaire et en réponse aux dommages de l'ADN. Dans une seconde partie, l'importance de cette kinase dans l'hématopoïèse normale et leucémique sera présentée. Dans la dernière partie de l'introduction, la protéine USP7, ses différents rôles, notamment sur la protéine CHK1, et son importance dans les tumeurs hématopoïétiques seront décrits.

Partie 1 : CHK1 dans le cycle cellulaire et les cancers

I. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est essentiel à la vie, puisqu'il permet à un organisme pluricellulaire de se développer à partir d'une cellule unique appelée zygote. Au cours d'un cycle cellulaire, une cellule mère pourra donner naissance à deux cellules filles. Ce cycle cellulaire permet de maintenir l'homéostasie tissulaire en assurant le renouvellement des cellules. Dans cette introduction, les phases du cycle cellulaire ainsi que les grandes voies de régulation de ce cycle seront rapidement présentées.

1. [Les phases du cycle cellulaire](#)

Chez les eucaryotes, un cycle cellulaire est composé de 4 phases appelées G1, S, G2 et mitose. (Figure 1)

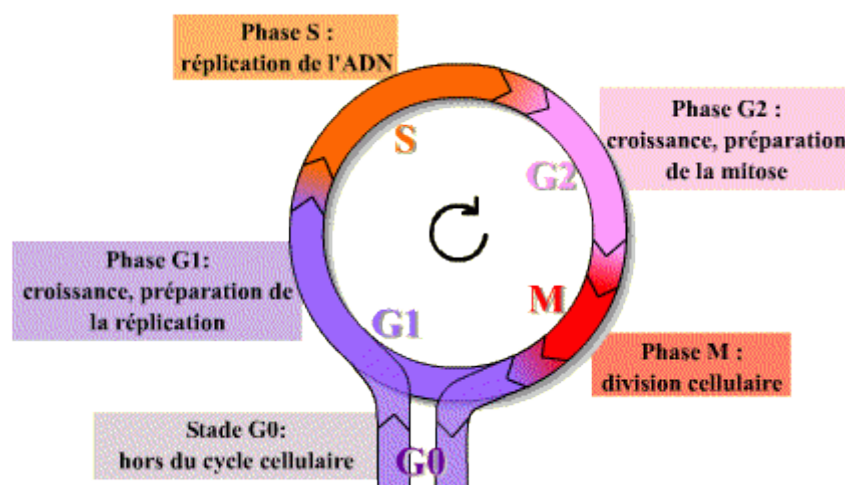


Figure 1 : Représentation schématique des phases du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est composé de 4 phases aboutissant à la division cellulaire. D'après Lebart et al., 2019.

Les trois premières phases du cycle cellulaire, G1, S et G2, représentent l'interphase, durant laquelle le noyau de la cellule est limité par une enveloppe nucléaire. L'interphase représente généralement 95% de la durée d'un cycle cellulaire (Cooper, 2000).

La **phase G1** représente un intervalle (gap en anglais, correspondant au G) où la cellule n'est pas encore dans la phase de division cellulaire, mais se prépare à effectuer correctement cette division. L'intégrité du matériel génétique de la cellule va être contrôlé. Lors de la **phase S**, l'information génétique est répliquée de manière complète et non redondante, pour permettre la formation de chromosomes à deux chromatides sœurs. Cette étape cruciale conditionne l'intégrité de l'information génétique qui sera transmise aux cellules filles. Une fois la réplication de l'ADN terminée, la **phase G2** va commencer pour permettre à la cellule de se préparer à la mitose, notamment *via* la réplication du centrosome, organe non membraneux qui permet l'organisation de l'assemblage des fibres du cytosquelette appelées microtubules.

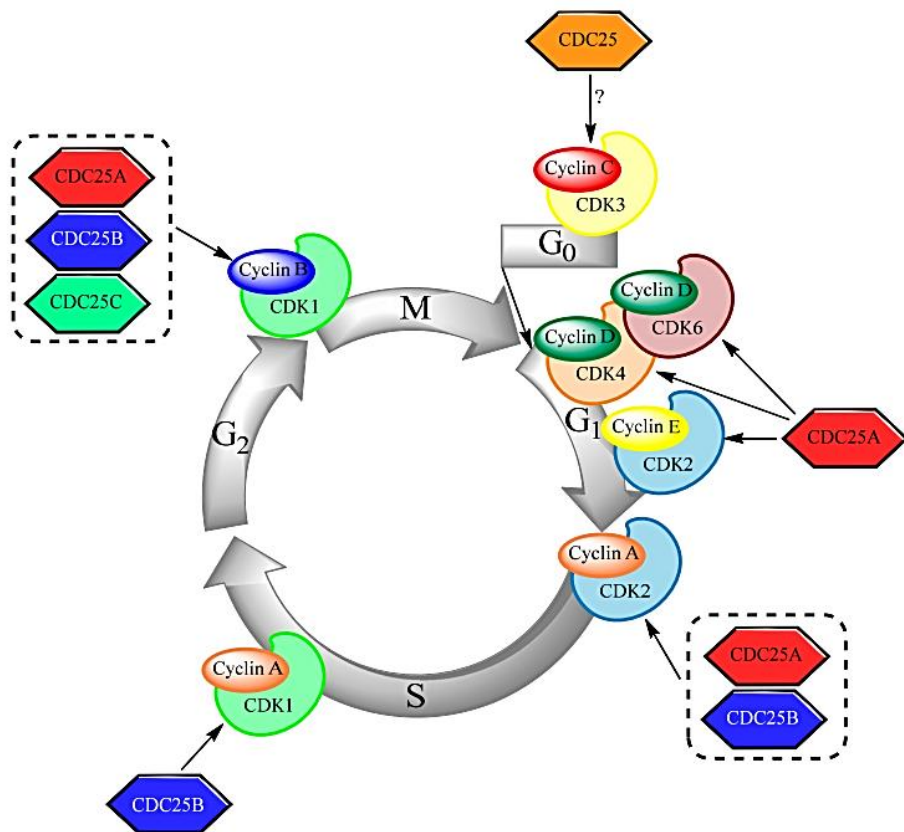
La dernière phase du cycle cellulaire est la **mitose**, phase la plus courte du cycle, permettant la ségrégation du matériel génétique pour donner les deux cellules filles possédant un matériel génétique équivalent. Cette dernière phase est divisée en 5 étapes différentes qui sont : la prophase, la proméphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase/cytocinèse.

2. Les points de contrôle du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire décrit précédemment doit être finement contrôlé pour assurer son bon déroulement. De ce fait, différents acteurs entrent en jeu au cours de ce cycle.

2.1. Les Cyclin-Dependent Kinases (CDK) régulatrices du cycle cellulaire

Le contrôle de la progression dans le cycle est assuré par les **kinases dépendantes des cyclines**, appelées CDK pour Cyclin-Dependent Kinase, qui agissent en association avec des **cyclines** régulatrices, dans des phases précises du cycle cellulaire (Figure 2). Chez les mammifères, il existe 21 CDK et 13 cyclines (Malumbres, 2014). Ces différentes cyclines subissent des variations de leur taux au cours du cycle, et sont définies par une région commune permettant de se lier et d'activer les CDK. Ces complexes CDK-Cyclines vont, grâce à leur activité kinase, phosphoryler des substrats spécifiques, nécessaires au bon déroulement des différentes phases du cycle.



**Figure
des**

complexes CDK-cyclines dans le cycle cellulaire. Différents complexes CDK-cycline régulent les phases du cycle cellulaire, eux-mêmes contrôlés par les phosphatases CDC25. D'après Brenner et al., 2014.

2 : Rôles

Il est important de noter que les complexes décrits dans la Figure 2 ne sont pas aussi simple, puisque les cyclines A, B, C, D et E sont en réalité des groupes constitués de plusieurs cyclines (A1, A2, B1, B2, B3, D1, D2, D3, E1, E2) qui sont des protéines codées par différents gènes.

La régulation de la quantité et de l'activité des complexes CDK-cyclines permet de contrôler la vitesse et la progression du cycle. Par conséquent, une augmentation aberrante de l'activité des CDK entraîne une prolifération cellulaire incontrôlée pouvant favoriser le développement et la progression de cancers.

Puisque les CDK ont un niveau d'expression constant au cours du cycle cellulaire, la régulation des complexes se fait à d'autres niveaux, notamment *via* le niveau d'expression des cyclines qui est modulé au cours du cycle, *via* leur liaison avec les inhibiteurs de CDK, des Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor CKI (tels que p16, p21 ou p27), et le statut de phosphorylation des CDK. Ce dernier aspect implique la kinase Wee1 induisant des phosphorylations inhibitrices, ainsi que les phosphatases de la famille des **CDC25** permettant, elles, la **déphosphorylation activatrice des complexes** (Malumbres, 2014 - Brenner et al., 2014)

2.2. Contrôle d'un cycle cellulaire normal

En complément de ces cyclines régulant la progression du cycle, des points de contrôle existent pour préserver l'intégrité de la cellule aux moments critiques du cycle cellulaire. Ces points de contrôle ou « **checkpoints** » sont mis en place pour contrôler que la phase du cycle s'est correctement déroulée avant de commencer la suivante, et ainsi déterminent l'arrêt ou la progression du cycle. Ces points de contrôle sont retrouvés au niveau des transitions G1/S et G2/M, mais également en intra-S et pour contrôler l'assemblage du fuseau mitotique.

2.3. Contrôle d'un cycle cellulaire avec dommages de l'ADN

Au cours du cycle cellulaire, l'ADN contenu dans chacune des cellules est soumis à des stress extrinsèques (radiations, stress génotoxiques...) ou intrinsèques (radicaux oxygénés, erreurs de réplication...), susceptibles de créer des dommages à l'ADN. Si l'ADN présente des lésions, si la réplication n'a pas lieu correctement ou si des dommages sont transmis aux cellules filles pendant la mitose, les points de contrôle du cycle cellulaire permettent à la cellule d'identifier ces dommages, et d'induire une réponse adaptée en retardant la progression du cycle et en activant les voies de réparation des dommages de l'ADN. Dans le cas de dommages trop importants, les acteurs des points de contrôle participent alors à l'induction de la mort cellulaire. Ainsi, les points de contrôle du cycle cellulaire contribuent au maintien de l'intégrité du génome et par conséquent, évitent le développement de maladies associées à de l'instabilité génomique, comme les cancers.

Différentes lésions activent les voies de signalisation communes, dont le but est de maintenir les complexes CDK-cyclines et les phosphatases CDC25 dans un état inactif, pour bloquer le cycle cellulaire jusqu'à la réparation de ces lésions. Les acteurs clés de cette réponse des dommages à l'ADN sont les kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and Rad3 Related), qui initient la cascade de réparation des dommages. Classiquement, il est admis que la kinase ATM est activée après cassures double brin de l'ADN, tandis que la kinase ATR serait activée suite à des cassures simple brin, à des blocages de fourche de réplication ou à une vitesse de réplication inadaptée. En réalité, de nombreux stress cellulaires entraînent à la fois des cassures simples ou double brins de l'ADN et des stress réplicatifs, et les kinases ATM et ATR sont souvent actives conjointement et coopèrent lors de l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire (Figure 3).

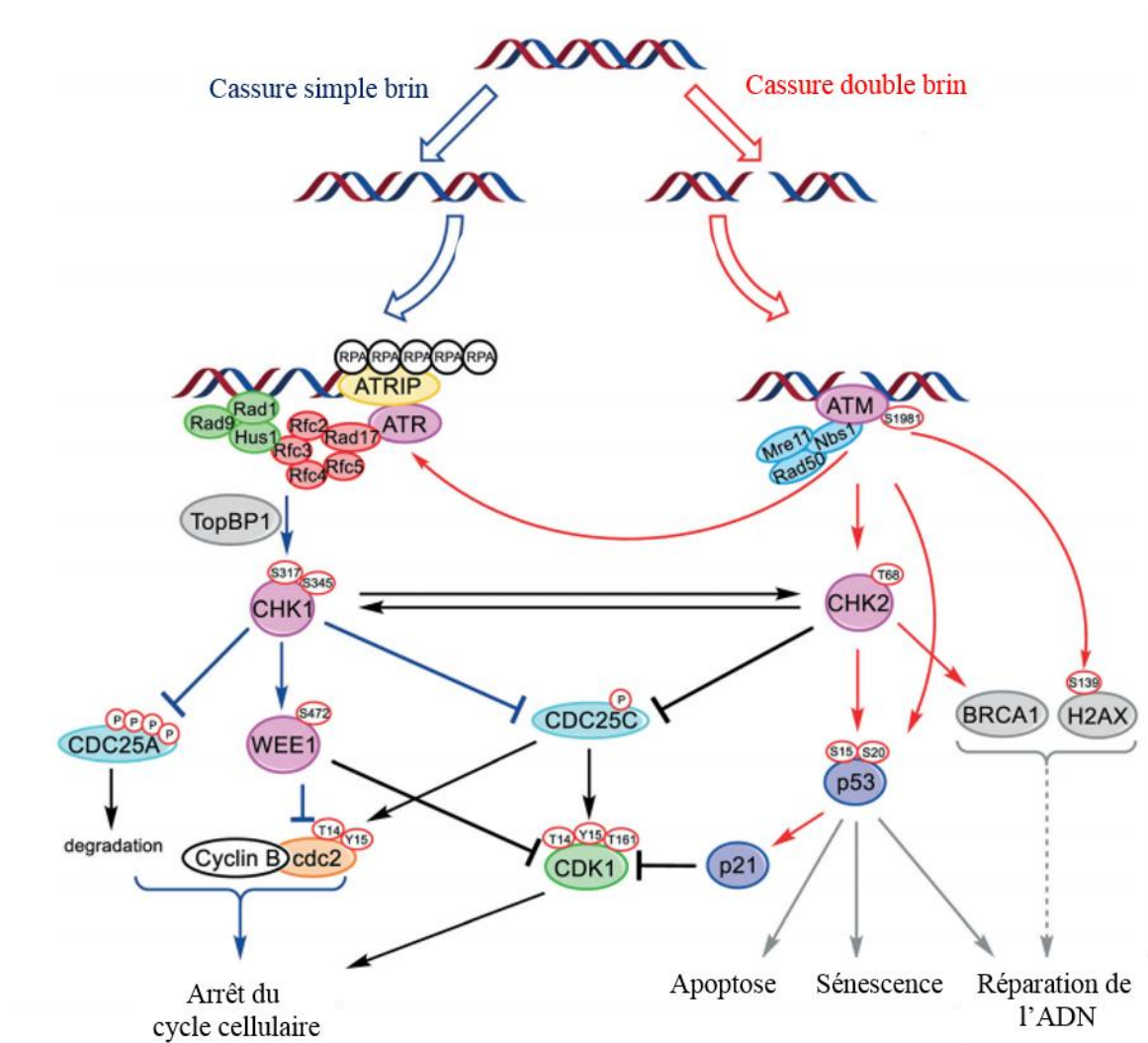


Figure 3 : Les composants de la réponse aux dommages à l'ADN. Suite à des cassures simples ou doubles brin, les kinases ATR et ATM vont respectivement être activées dans le but de maintenir les complexes CDK-cyclines et les phosphatases CDC25 dans un état inactif. Ainsi, en inhibant directement les CDC25, en activant les kinases inhibitrices des complexes (comme Wee1) ou en activant des Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor CKI (comme p21), les kinases CHK1 et CHK2 vont bloquer le cycle cellulaire jusqu'à la réparation des lésions ou l'induction de l'apoptose. D'après Ronco et al., 2016.

La kinase **ATM** est activée par le complexe MRN (MRE11, RAD50 et NBS1) au niveau de la cassure double brin, et phosphoryle de nombreuses protéines effectrices telles que CHK2, H2AX et p53. En revanche, **ATR** est activée par la protéine RPA (Replication Protein A) après cassure simple brin. ATR interagit avec la protéine ATRIP et de nombreuses autres protéines telles que le complexe Rad17-RFC5 et Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1 complexe). Il recrute à son tour la topoisomérase II (TOPBP1) qui active ATR. Une fois activée, ATR va alors phosphoryler la kinase en aval, **CHK1** (Figure 3) (Ronco et al., 2016).

Mon travail de thèse s'est focalisé sur la sérine/thréonine kinase CHK1, substrat de la kinase ATR, et acteur clé dans le contrôle du cycle cellulaire et le maintien de l'intégrité génomique.

II. La protéine Checkpoint Kinase 1

1. Découverte de CHK1

En 1993, Walorth et ses collaborateurs ont identifié chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* une nouvelle protéine kinase impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en présence de dommages à l'ADN. Le gène codant pour cette protéine a alors été appelé *CHEK1* pour **checkpoint kinase 1** (Walworth et al., 1993). En 1997, des protéines homologues ont été identifiées chez la drosophile, la souris et l'homme, et CHK1 s'est avérée présente chez tous les eucaryotes et très conservée entre les espèces. Chez l'homme, le gène *CHEK1* codant pour la protéine CHK1 est localisé sur le chromosome 11, locus 11q24.2, et la forme totale de la protéine est composée de 476 acides aminés pour un poids moléculaire de 56 kDa (Figure 4) (Sanchez et al., 1997).

2. Mise en évidence des premières fonctions de CHK1

Les premiers travaux sur les fonctions de CHK1 chez les mammifères ont mis en évidence que la surexpression de CHK1 induit une accumulation de CDC2 (CDK1) inactif, permettant ainsi l'arrêt en G2 (O'Connell et al., 1997). Par la suite, la **délétion de CHK1** chez la souris s'est révélée **létale** à un stade embryonnaire précoce (E6,5), due à de sévères défauts dans la prolifération cellulaire (Liu Q et al., 2000), avec notamment des noyaux anormaux au stade blastocyste chez les embryons CHK1^{-/-} et une mort par apoptose de ces cellules (Takai H et al., 2000). De plus, des défauts d'arrêt du cycle avant l'entrée en mitose, en réponse à des dommages à l'ADN ou à un blocage de réplication, sont retrouvés dans ces embryons de souris CHK1^{-/-}, induisant des catastrophes mitotiques (Takai H et al., 2000).

Plus tard, Lam et ses collaborateurs ont contribué à la mise en évidence des fonctions de CHK1 en utilisant des souris adultes dans lesquelles CHK1 est invalidée de façon conditionnelle (Lam et al., 2004). Dans ces travaux, les souris haplo-insuffisantes conditionnelles pour CHK1 présentaient une augmentation du nombre de cellules en phase S en comparaison aux souris contrôles, ainsi qu'une augmentation des dommages à l'ADN. De plus, le cycle cellulaire des cellules de l'épithélium mammaire de ces souris haplo-insuffisantes est dérégulé, puisque les cellules en phase S présentent un phénotype correspondant à un début de mitose. A cause de cette haplo-insuffisance pour CHK1, ces cellules maintiennent un haut niveau de CDC25A, promouvant des transitions inappropriées du cycle cellulaire.

Avec l'ensemble de ces premiers travaux majeurs, CHK1 apparaît comme contrôlant le bon déroulement de la réplication et de la réponse aux dommages de l'ADN, ainsi que le bon

déroulement du cycle cellulaire, notamment l'entrée en mitose. Aujourd'hui, de nombreux travaux démontrent l'importance de CHK1 dans la régulation du cycle cellulaire, à la fois en réponse à des dommages à l'ADN et lors d'un cycle cellulaire non perturbé.

Dans cette partie du travail bibliographique, la structure et la régulation de la kinase CHK1 seront présentées, ainsi que ses différents rôles, et son implication dans les cancers.

3. Structure de CHK1

La sérine-thréonine kinase CHK1 présente une structure possédant un domaine kinase et un domaine régulateur. Le domaine N-terminal de CHK1 allant des acides aminés 1 à 265 contient le domaine de fixation à l'ATP et le domaine catalytique. En partie C-terminale, le domaine régulateur de CHK1 présente plusieurs sites de phosphorylation décrits pour moduler son activité ou sa localisation, ainsi que les séquences d'export nucléaire (NES) ou de localisation nucléaire (NLS). CHK1 possède un domaine PIP box, dans la région C-terminale entre les résidus 374 et 381, nécessaire pour son interaction avec la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), et cruciale pour l'arrêt du cycle en S et G2-M ainsi que pour une réplication correcte en contribuant à l'activation de CHK1 (Scorah et al., 2008). Enfin, un domaine KA1 (Kinase Associated 1) est présent dans la partie C-terminale de CHK1, et des mutations dans cette région induisent une activité constitutive de CHK1 (Gong et al., 2015) (Figure 4).

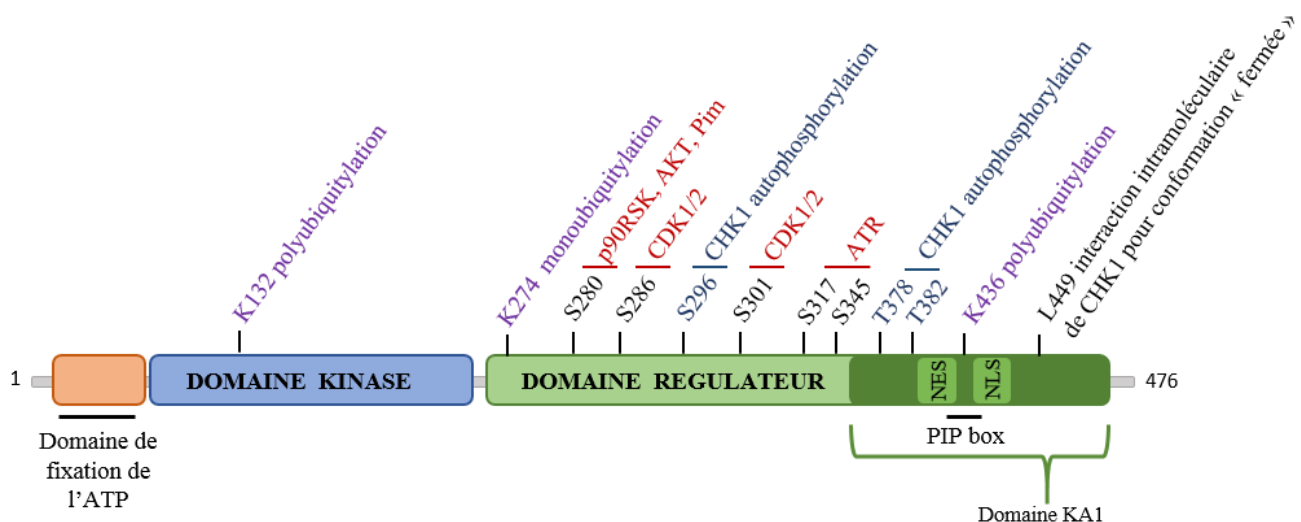


Figure 4 : Structure de la protéine CHK1 humaine et présentation de ses sites de modifications post-transcriptionnelles. Adapté de Zhang et al., 2014a.

Il est intéressant de noter qu'en plus de la forme totale de CHK1 présentée ci-dessus, une étude décrit l'existence d'un variant d'épissage de CHK1 tronquée au niveau du domaine de fixation de l'ATP en N-terminal. Cette protéine CHK1-S est décrite comme interagissant avec la forme totale de CHK1 pour

agir en tant que répresseur endogène. En effet, la surexpression de CHK1-S induit une entrée prématurée des cellules en mitose et des catastrophes mitotiques. D'après les auteurs, cette interaction aurait lieu dans des cellules non soumises à un stress, pour réprimer l'activité de CHK1, et en cas de dommages, la phosphorylation de CHK1 permettrait la dissociation entre le CHK1 pleine taille et la forme de plus faible poids moléculaire CHK1-S. Ce variant d'épissage permettrait une régulation rapide et réversible de CHK1 (Pabla et al., 2012).

Une étude publiée cette année décrit elle aussi l'existence d'une autre forme tronquée de CHK1. En effet, la métallo-protéase SPRTN est capable de cliver la partie C-terminale de CHK1 pour générer au moins 3 fragments de CHK1 (Figure 5). De manière intéressante, ces fragments ont une activité kinase 5 à 10 fois plus importante que CHK1 pleine taille (Halder et al., 2019). Ainsi, SPRTN joue un rôle important, dans l'activation de CHK1 lors de la réplication de l'ADN dans un cycle cellulaire non perturbé. CHK1 pleine taille et sa forme tronquée sont capables ensuite de phosphoryler SPRTN dans son domaine régulateur, stimulant ainsi le recrutement de SPRTN à la chromatine pour permettre la progression des fourches de réplication.

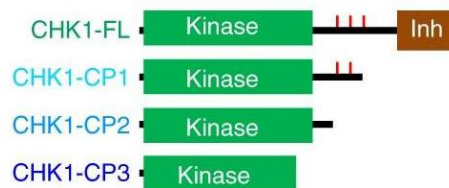


Figure 5 : Représentation schématique des formes tronquées de CHK1 par SPRTN. La métallo-protéase SPRTN est capable de cliver la partie C-terminale de CHK1 pour générer au moins 3 fragments de CHK1. Ici, CHK1 FL représente la pleine taille de CHK1. Les fragments CP1 CP2 et CP3 représentent les formes clivées de CHK1, possédant une activité kinase augmentée par rapport à la pleine taille de CHK1. D'après Halder et al., 2019.

4. [L'activation de CHK1](#)

Peu après la découverte de CHK1, des travaux décrivent pour la première fois que CHK1 est phosphorylée après l'induction de dommages à l'ADN, dans un premier temps chez *S. pombe* (Walworth et al., 1996). Un an plus tard, des observations similaires ont été effectuées chez le Xénope et chez l'homme (Sanchez et al., 1997). Par la suite, des travaux ont rapporté que la phosphorylation de CHK1 était régulée de manière dépendante de la caféine, un inhibiteur des kinases ATM et ATR, laissant envisager que CHK1 est une cible potentielle de ces kinases (Moser et al., 2000). La phosphorylation de CHK1 sur les résidus sérine 317 et sérine 345 a ensuite été démontrée expérimentalement, et cette phosphorylation est retrouvée conservée chez la levure, le xénope et l'homme (Guo et al., 2000 – Lopez-Girona et al., 2001 – Chen et al., 2004). Depuis, la cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation et l'activation de CHK1 a été largement étudiée.

4.1. [L'activation classique de CHK1 par phosphorylations](#)

Suite à une lésion simple brin induite par différents types de stress (rayonnements UV, stress réplicatif, agents génotoxiques ...), des complexes Rad9-Rad1-Hus1 (complexe 9-1-1) sont recrutés sur les sites de dommages par Rad17. En parallèle, des protéines RPA viennent de part et d'autre de la cassure pour former une plateforme de recrutement pour la protéine ATRIP, permettant à son tour le

recrutement de la kinase ATR. La protéine TopBP1 est également recrutée à ce niveau pour favoriser la phosphorylation des substrats d'ATR (Figure 6). CHK1 se retrouve alors localisée de manière transitoire au site du dommage et est activée *via* une phosphorylation de ses résidus sérine 317 et Ser 345 par ATR (Toledo et al., 2011). Ces phosphorylations de CHK1 par ATR requièrent une protéine adaptatrice, la Claspine. En effet, lors de la mise en place du point de contrôle des dommages de l'ADN, TopBP1 permet l'interaction entre la Claspine et CHK1. La Claspine va alors servir de protéine adaptatrice pour faciliter la phosphorylation de CHK1 par ATR (Kumagai et al., 2000 - Liu et al., 2006a) (Figure 6).

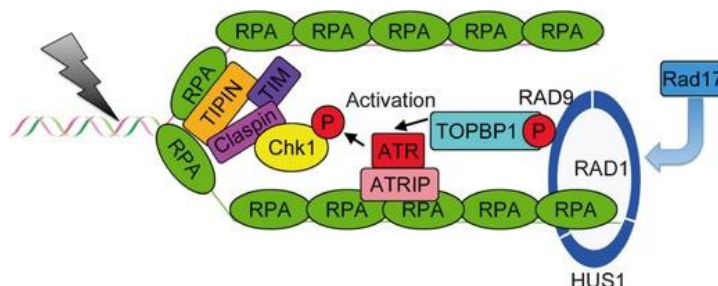


Figure 6 : Modèle d'activation de CHK1 en réponse à des dommages de l'ADN. Suite à des dommages simple brin, RPA est recrutée de part et d'autre de la cassure pour permettre la fixation du complexe ATR/ATRIP. En parallèle, Rad17 permet le recrutement du complexe 9-1-1, et de TopBP1 pour favoriser la phosphorylation des substrats d'ATR et activer CHK1. D'après Goto et al., 2012.

Une fois phosphorylée sur ces deux résidus, CHK1 va s'auto-phosphoryler sur la sérine 296 pour permettre son activation complète (Okita et al., 2012). Les résidus sérine 317 et 345 vont alors rapidement être déphosphorylés par les phosphatases PP1 et PP2A pour permettre de la stabiliser (den Elzen et al., 2004 – Leung-Pineda et al., 2006). CHK1 phosphorylée en sérine 296 va ensuite être relarguée de la chromatine pour induire la réponse aux dommages en phosphorylant ses substrats.

4.2. Modèle d'activation conventionnelle de CHK1 par modification conformationnelle

En plus de cette cascade de phosphorylation décrite précédemment, des modifications conformationnelles de CHK1 sont nécessaires pour permettre son activation. En effet, la conformation de CHK1 conditionne l'accès à son site catalytique.

En absence de stress répliatif ou de lésions à l'ADN, CHK1 adopte une **conformation dite « fermée »**, où le domaine C-terminal de la protéine interagit avec son domaine N-terminal et masque son domaine kinase. Dans cette conformation, CHK1 est ainsi stabilisée, mais son site catalytique est inaccessible pour les substrats (Figure 7) (Katsuragi et al., 2004). Face à des dommages à l'ADN, ATR va phosphoryler CHK1 sur les résidus sérine 317 et 345, perturbant l'interaction intramoléculaire de la protéine, conduisant à son ouverture et à l'exposition de son domaine catalytique (Figure 7). CHK1 est donc en **conformation dite « ouverte »** et va pouvoir s'auto-phosphoryler sur la sérine 296 pour finaliser son activation et phosphoryler ses substrats en aval. Le résidu leucine 449 présent dans la partie C-terminale de CHK1 (Figure 4) semble responsable de cette interaction intramoléculaire de CHK1

donnant sa conformation « fermée ». En effet, la mutation de ce résidu perturbe l'interaction entre les domaines C- et N-terminaux de CHK1, et entraîne l'ouverture de la protéine (Han et al., 2016).

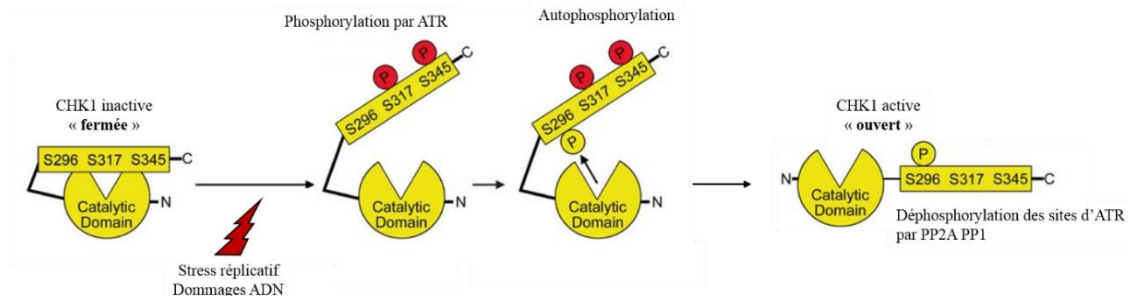


Figure 7 : Modèle d'activation de CHK1 par phosphorylation et changement conformationnel. Après phosphorylation par ATR, la protéine CHK1 va adopter une conformation ouverte et s'autophosphoryler pour finaliser son activation. D'après Goto et al., 2012.

4.3. La levée du point de contrôle : fin d'activation de CHK1

La phosphorylation de CHK1 par ATR, décrite ultérieurement sur la sérine 345, active CHK1 mais rend également la kinase sensible à la dégradation. En effet, la phosphorylation sur ce site permet la polyubiquitylation de CHK1 médiée par le complexe E3 ligase composé de la Cul4 ou Cul1 (Zhang et al., 2005). La dégradation de CHK1 activée est nécessaire pour permettre la levée des points de contrôle dans un contexte normal, mais peut également se révéler importante dans les effets cytotoxiques de drogues génotoxiques en lien avec le cancer. Le délai entre l'activation de CHK1 par ATR et sa dégradation doit donc être régulé et est déterminé par le fait que CHK1 n'est accessible aux ubiquitines ligases que si elle est dissociée de la chromatine.

La régulation de la stabilité de CHK1 sera abordée plus en détail dans la suite de cette introduction.

4.4. Autres régulations de l'activité de CHK1

La voie d'activation décrite précédemment, est la voie d'activation conventionnelle de CHK1, largement documentée dans la littérature. Mais tous les aspects de la régulation de l'activité de CHK1 ne peuvent être expliqués par la phosphorylation médiée par ATR ou ATM. En effet, en plus de ce modèle classique d'activation de CHK1, l'activité de CHK1 peut être régulée à de nombreux autres niveaux.

a. Régulation de l'activité par phosphorylation

➤ La sérine 280

En plus de son activation classique *via* la phosphorylation de ses sérines 317 et 345, l'activité de CHK1 peut être régulée suite à la phosphorylation de son résidu **sérine 280**. En effet, des travaux effectués dans mon équipe de thèse ont montré que CHK1 pouvait être phosphorylée sur le résidu sérine 280 par les **kinases PIM1 et PIM2** dans des lignées leucémiques exprimant le récepteur FLT3 muté

(FLT3-ITD), et que cette phosphorylation exacerbe les fonctions de CHK1 en réponse aux dommages à l'ADN pour la mise en place du point de contrôle G2/M (Yuan et al., 2014a).

De manière intéressante, la sérine 280 (S280) de CHK1 est également décrite comme pouvant **à la fois jouer sur sa relocalisation cytoplasmique et nucléaire**. En effet, une première étude de Puc et ses collaborateurs montre, dans un modèle de cellules déficientes pour PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), que CHK1 est phosphorylée sur la S280 par AKT, entraînant sa localisation cytoplasmique. Ceci empêche CHK1 d'agir, et ces cellules présentent donc un **défaut d'activation du point de contrôle G2/M** (Puc et al., 2005). Dans un autre contexte cellulaire, les travaux de Li et ses collaborateurs montrent une phosphorylation de CHK1 sur ce même résidu par les kinases p90 RSK induisant un recrutement de CHK1 au niveau du noyau. Par l'utilisation de mutants, leur étude valide ce mécanisme, puisqu'un mutant non phosphorylable S280A ne subit pas de changement de localisation tandis que le recrutement nucléaire est exacerbé pour le mutant de CHK1 phosphomimétique S280E. De manière intéressante, cette phosphorylation sur la S280 par p90RSK **renforce le point de contrôle G2/M** médié par CHK1 en réponse à des stress génotoxiques (Li et al., 2012). Les raisons expliquant cette différence de localisation suite à la phosphorylation du même site S280 ne sont pas encore définies, mais nous pouvons envisager que les différentes kinases induisant cette phosphorylation permettent le recrutement de partenaires impactant différemment la localisation de CHK1.

➤ Les sérines 286 et 301

D'autres phosphorylations de CHK1 ont également été montrées comme jouant un rôle dans sa localisation et son activité. En effet, lorsque la cellule est prête à entrer en mitose, CHK1 est phosphorylée sur ses résidus **Sérine 286 et Ser301** par CDK1, ce qui conduit à sa **translocation du noyau vers le cytoplasme** pendant la prophase *via* la protéine Exportin 1. L'exclusion nucléaire de CHK1 lève l'inhibition de CDK1 par CHK1 et permet à la cellule d'entrer en mitose (Enomoto et al., 2009).

➤ Les thréonines 378 et 382

Comme présenté précédemment, CHK1 possède un **domaine KA1** (Kinase Associated 1) dans sa partie C-terminale (Figure 4), et cette région se révèle importante pour une auto-inhibition de CHK1. En effet, des mutations dans ce domaine KA1 confèrent une activation constitutive de CHK1, augmentant son activité catalytique basale et stimulant son autophosphorylation sur deux nouveaux sites identifiés que sont les **thréonines 378 et 382** (Gong et al., 2015 – Emptage et al., 2017) (Figure 4). Récemment, l'autophosphorylation de CHK1 sur ces deux thréonines présentes dans le domaine KA1, s'est révélée impliquée à la fois dans l'activation et la dégradation de CHK1 (Gong et al., 2018). En effet, l'induction d'un mutant phosphomimétique de ces deux sites dans des cellules lymphoblastiques induit un arrêt des cellules en phase G2, montrant une activation du point de contrôle par CHK1. De plus, ce mutant de CHK1 se révèle moins stable comparativement à la forme sauvage, du fait d'une dégradation accrue par le protéasome. Il est intéressant de noter que ces autophosphorylations ont lieu

indépendamment d'une phosphorylation préalable sur la sérine 345 par ATR, et qu'elles ne sont pas augmentées par l'induction d'un stress génotoxique (Gong et al., 2018), mettant bien en lumière une activation de CHK1 indépendamment de la voie dommages-ATR.

b. Régulation de l'activité par déubiquitylation

Un autre mécanisme de régulation indirecte de l'activité de CHK1 se fait par la déubiquitylase **USP3**. En réponse à un stress génotoxique, une chaîne d'ubiquitines reliées en K63 est ajoutée à CHK1 par l'E3 ligase Cul4 sur la K132 au niveau du domaine kinase de CHK1 (Figure 4), pour permettre sa localisation nucléaire, son association à la chromatine et son activation (Cheng et al., 2013a). De manière intéressante, une étude a montré que cette chaîne d'ubiquitine peut être éliminée par la déubiquitylase USP3. En effet, l'inactivation d'USP3 induit une augmentation de l'ubiquitylation K63 sur CHK1, conduisant à une association de CHK1 à la chromatine et une phosphorylation prolongée de la kinase. A l'inverse, la présence d'USP3 permet la déubiquitylation de ces chaînes K63, permettant de libérer CHK1 de la chromatine et rendre son site catalytique disponible pour ses substrats (Cheng et al., 2018).

L'ensemble de ces études permettent de mieux comprendre la régulation de l'activité de CHK1 et montrent que cette activation n'est pas toujours dépendante des dommages de l'ADN.

D'autre part, l'expression de CHK1, sa stabilité et sa localisation sont également très régulées.

5. La régulation du niveau de CHK1

Lors d'une étude s'intéressant au niveau d'expression de la protéine CHK1, Kaneko et ses collaborateurs ont montré que CHK1 était exprimée de manière différentielle au cours du cycle cellulaire dans des fibroblastes humains. En effet, CHK1 est retrouvée peu exprimée dans ces cellules pendant la phase G1, puis son expression augmente pour être fortement exprimée au cours des phases S, G2 et M (Kaneko et al., 1999). Cette étude montre que le niveau de CHK1 est régulé au cours du cycle cellulaire. **Avec les données de la littérature disponibles, il est maintenant clair que CHK1 est en effet régulée aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.**

5.1. Régulation transcriptionnelle

Le premier régulateur transcriptionnel de *CHEK1* identifié fut la protéine **p53**. En effet, l'induction de p53 entraîne une réduction de CHK1, à la fois au niveau du transcrit que de la protéine, montrant que p53 est un répresseur transcriptionnel de CHK1, impliquant les protéines p21 et RB (Gottifredi et al., 2001).

CHEK1 a également été identifié comme un gène cible du facteur de transcription **E2F** dans des fibroblastes humains (Ren et al., 2002). Il a de plus été montré que E2F1 était capable d'induire l'activité du promoteur de CHK1, et qu'elle était abolie par l'expression d'une forme mutée de E2F1 incapable de se lier à l'ADN (Carrassa et al., 2003).

Par ailleurs, le facteur de transcription **E4F1**, connu pour réguler directement l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, le maintien de l'intégrité du génome, la survie et la fonction des cellules hématopoïétiques (Grote D., et al., 2015 - Rodier G., et al., 2015) a également été décrit comme capable de réguler CHK1. E4F1 est en effet un activateur transcriptionnel de *CHEK1*, puisque l'invalidation d'E4F1 entraîne une diminution du niveau de l'ARNm et de la protéine CHK1 (Rodier G., et al., 2015). Pourtant, seule une petite réduction de la transcription de l'ARNm de CHK1 est observée dans les cellules invalidées pour E4F1, ce qui suggère que la régulation transcriptionnelle ne peut complètement expliquer la réduction dramatique du niveau de CHK1 observée (Grote D., et al., 2015). Il apparaît en fait que les protéines E4F1 et CHK1 sont présentes dans un même complexe, et qu'une surexpression d'E4F1 induit une diminution de l'ubiquitylation de CHK1 et une diminution de sa dégradation (Grote D., et al., 2015). Ces résultats permettent d'envisager un rôle d'E4F1 sur la stabilité de la protéine CHK1.

Enfin, plusieurs autres facteurs de transcription ont été décrits comme capable de réguler *CHEK1* dans un contexte oncogénique. Le facteur de transcription **ERG**, appartenant à la famille ETS, est retrouvé surexprimé dans 50% des cancers prostatiques et est capable de réprimer l'expression de l'ARNm de CHK1 au niveau transcriptionnel en se liant directement à son promoteur dans les cellules HEK-293 (Lunardi A., et al., 2015). Dans un contexte de Leucémie Aiguë Lymphoblastique, le facteur de transcription oncogénique **TLX1** (T cell leukemia homeobox protein-1) réprime directement la transcription de CHK1 (De Keersmaecker et al., 2010). Dans les ostéoblastes le facteur de transcription **Fos**, appartenant à la famille AP-1, favorise la transcription de CHK1 en réponse à un stress réplcatif (Schulze et al., 2014). Enfin dans les cancers possédant le facteur de transcription **c-Myc** surexprimé, notamment dans les lymphomes de type B, les neuroblastomes et certains cancers du sein, il permet la transcription de manière indirecte de CHK1 (Höglund et al., 2011) (Figure 8).

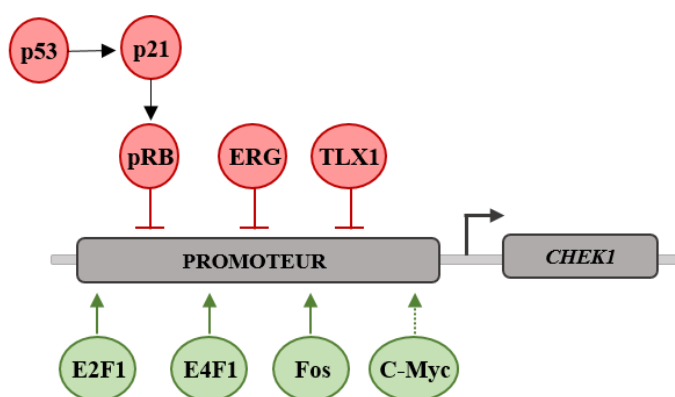


Figure 8 : Représentation schématique des régulations transcriptionnelles de CHK1. Différents facteurs de transcription régulent l'expression de CHK1 positivement ou négativement.

5.2. Régulation traductionnelle

La régulation traductionnelle de CHK1 est principalement due à l'interférence entre l'ARNm de CHK1 et des micro-ARN.

Les micro-ARN (miARN) sont un groupe de petites molécules d'ARN non codant, permettant de réguler l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel, en réprimant ou en entraînant la dégradation de l'ARNm. Différents miARN ont été décrits comme régulant l'ARNm de CHK1, dont le **miR-16**, le **miR-26a** et le **miR-424**. Il a en effet été décrit que p53 favorise l'expression du miR-16 et du miR-26a, dont les cibles majeures sont les ARNm de CHK1 et Wee1 (Lezina L., et al 2013). De plus, il est décrit que l'expression du miR-424 est inversement corrélée à l'expression protéique de CHK1, à la fois dans des cancers du col de l'utérus et dans des tissus normaux, laissant envisager que le miR-424 agirait comme un régulateur post-transcriptionnel négatif sur l'ARNm de CHK1 (Xu et al., 2013).

Récemment, une nouvelle régulation traductionnelle pour CHK1 a été identifiée. Lors d'une étude portant sur l'identification du rôle de longs miARN dans le cancer du sein, les auteurs ont mis en évidence que le groupe de **miARN-195-497** (appartenant à la famille du miR-15), peut cibler négativement l'ARNm de CHK1, et que le long ARN non codant **lncRNA CASC9** (Cancer susceptibility candidate 9) quant à lui régule positivement le niveau de CHK1 en se liant aux miARN-195-497, réprimant ainsi leur action. De manière intéressante, ce lncRNA CASC9 est retrouvé surexprimé dans les cancers du sein, pouvant expliquer la forte expression de CHK1 dans cette pathologie (Shao et al., 2019).

5.3. Régulation de la stabilité de CHK1

a. *Par ubiquitylation*

Les niveaux protéiques de CHK1 sont finement régulés par la voie de dégradation du protéasome. Deux complexes CRL (Cullin RING Ligase) E3s ont été décrits pour réguler l'abondance de CHK1 : un formant le complexe **SKP1-Cullin1(Cul1)-Fbx6** ubiquitylant CHK1 dans le noyau (Zhang et al., 2009), et l'autre formant le complexe **CDT2-Cullin4A(Cul4A)-DDB1** ubiquitylant CHK1 dans le cytoplasme (Leung-Pineda et al., 2009). La voie ubiquitine-déubiquitine sera détaillée dans la partie 3 de mon introduction de thèse, mais quelques informations concernant la régulation de CHK1 sont abordées dès à présent.

La reconnaissance de CHK1 par les complexes CRL E3s se fait par la protéine DDB1 ou Fbx6.

DDB1 (damaged DNA-binding protein 1) fait partie d'un complexe E3 ligase incluant des protéines Cullin. Dans l'étude effectuée par Leung-Pineda et ses collaborateurs, CHK1 est retrouvée associée avec le complexe Cul4A/DDB1 au cours d'un cycle cellulaire non perturbé, et la phosphorylation de CHK1 ou l'induction de stress réplicatif favorise cette interaction, induisant son ubiquitylation et sa dégradation. Le niveau de CHK1 est ainsi régulé (Leung-Pineda et al., 2009).

La **Fbx6** (F-Box Protein 6) est une sous-unité du complexe SKP1-Cul1-Fbx6 E3 ligase (SCF). Lors d'un stress réplcatif, CHK1 activée va modifier sa conformation et exposer son domaine C-terminal, permettant la reconnaissance spécifique par Fbx6. Ceci va permettre à la protéine Fbx6 d'ubiquityler CHK1 sur la lysine 436 et entraîner sa dégradation dans le cytoplasme (Zhang et al., 2009).

Dans le cas de SKP1-Cul1-Fbx6, la dégradation de CHK1 s'avère être médiée par l'interaction de la Fbx6 avec un motif de dégradation spécifique (ou dégron) dans le domaine C-terminal de CHK1. Bien que la région exacte du dégron n'ai pas été identifiée, il est assigné à une région dans le domaine KA1 (acides aminés 368 – 421). Pour l'heure, il n'est pas connu si CUL4 – DDB1 – CDT2, et potentiellement d'autres complexes d'ubiquitine ligase, peuvent également interagir avec cette région dégron.

b. Par déubiquitylation

Pour contrecarrer l'ubiquitylation des protéines, un mécanisme de déubiquitylation existe. Cette voie sera détaillée dans la partie 3 de mon introduction de thèse, mais il est d'ores et déjà important de noter que CHK1 est déubiquitylée par au moins quatre **Ubiquitin-Specific Proteases** (USP).

Tout d'abord, **USP1** semble participer à la stabilité de la protéine CHK1, puisque l'inactivation d'USP1 induit une diminution du niveau de CHK1, mais aucune expérience ne met en évidence une interaction directe, ni le mécanisme de déubiquitylation (Guervilly et al., 2011). Une autre étude indique que **USP3** est capable de déubiquityler CHK1, mais ce mécanisme ne conduirait pas à une stabilisation de la protéine CHK1, mais à un relargage de la chromatine pour permettre à CHK1 d'accéder à ses substrats comme décrit précédemment (Cheng et al., 2018).

Seule, la déubiquitylase **USP7** a été décrite comme capable de réguler directement CHK1 dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome U2OS *via* son activité déubiquitylase (Alonso-de Vega et al., 2014) et également dans un modèle de cancer du sein où la protéine zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) favorise l'activité déubiquitylase d'USP7 sur CHK1 (Zhang et al., 2014b).

Enfin très récemment, un article prépublié dans BioRxiv, montre que **USP37** est également capable de réguler la stabilité de CHK1 en le déubiquitylant. L'inactivation d'USP37 entraîne la déstabilisation de CHK1, ainsi qu'une modification du cycle cellulaire et l'augmentation de dommages à l'ADN en réponse à un stress réplcatif (Singh et al., 2019).

Mes travaux de thèse m'ont amenée à m'intéresser à la régulation de la protéine kinase CHK1 par USP7 dans le contexte des Leucémies Aiguës Myéloïdes. Dans les parties 2 et 3 de mon introduction de thèse, j'aborderai donc ces différents aspects que sont les Leucémies Aiguës Myéloïdes, la déubiquitylase USP7 et leurs liens avec CHK1, et je présenterai ma problématique et les données générées sur ce sujet dans la première partie de mes résultats.

c. Par autophagie

Un autre mécanisme de dégradation, différent du mécanisme d'ubiquitylation, a été découvert comme impliqué dans la régulation de CHK1. L'autophagie médiée par des protéines chaperons (CMA, Chaperon-Mediated Autophagy) a été identifiée pour contribuer à la dégradation sélective de CHK1 phosphorylé en sérine 345 dans le noyau. En effet, dans des cellules déficientes pour l'autophagie médiée par les protéines chaperons, une accumulation nucléaire de CHK1 est retrouvée, ce qui perturbe la progression du cycle cellulaire (Park et al., 2015). Cette autophagie particulière conduit normalement à une dégradation de CHK1 par les lysosomes, limitant l'accumulation de CHK1 actif et favorisant donc la terminaison des points de contrôle.

6. Régulation de la localisation

La localisation de CHK1 constitue également un niveau de régulation important. En tant que protéine essentielle à l'induction des voies de réponse aux dommages, il paraît cohérent que sa localisation ne soit pas cantonnée aux sites de dommages. De plus, CHK1 possède deux motifs très conservés dans sa partie C-terminale qui fonctionnent comme un **signal d'export nucléaire** (NES) et de **localisation nucléaire** (NLS) (Wang et al., 2012a).

Lorsqu'elle est inactive, la localisation de CHK1 va varier, pouvant être retrouvée majoritairement cytoplasmique, seulement nucléaire, ou exprimée de manière pan-cellulaire selon le type de cellule. Malgré ces variations de localisation, en absence de stress ou dans des cellules sans dommages à l'ADN, environ 20% du CHK1 total est systématiquement présent au niveau de la chromatine (Gonzalez Besteiro et al., 2015 – Halder et al., 2019). De manière intéressante, la quantité de CHK1 retrouvée liée à la chromatine est inversement corrélée à l'étendue des dommages (Gonzalez Besteiro et al., 2015). En cas de stress génotoxique, CHK1 est rapidement dissociée de la chromatine suite à sa phosphorylation par ATR sur les résidus sérine 345 et 317 (Smits et al., 2006). Une fois dissociée, CHK1 phosphorylée se retrouve dans le nucléoplasme, où la protéine 14-3-3 va lier CHK1 et empêcher son export dans le cytoplasme (Jiang et al., 2003). Par la suite, pour être transportée dans le cytoplasme, CHK1 aura besoin de la protéine **Exportin 1 ou CRM1** (Chromosomal Maintenance 1) (Fukuda et al., 1997). De manière intéressante, les deux phosphorylations d'ATR n'ont pas les mêmes fonctions, puisqu'une **mutation de la sérine 345** entraîne un **défaut d'export de CHK1 dans le cytoplasme**, même si cette protéine mutée garde la capacité de se dissocier de la chromatine, tandis qu'une **mutation de la sérine 317 bloque la dissociation chromatinienn**e (Niida et al., 2007).

Enfin, au cours de la mitose, CHK1 va avoir des localisations bien précises. Dès la prophase, CHK1 est retrouvée présente au niveau des centrosomes. Au cours de la prométaphase et métaphase, CHK1 est retrouvée phosphorylée sur la sérine 317 au niveau des bras des chromosomes, puis pendant l'anaphase CHK1 est retrouvée phosphorylée sur les sérines 317 et 345 au niveau du fuseau de division mitotique. Enfin, CHK1 est retrouvée au niveau du midbody lors de la cytokinèse (Peddibhotla et al., 2009 – Wilsker et al., 2008). De plus, une partie de mes travaux de thèse, montrent que CHK1 phosphorylée

sur la sérine 280 présente également des localisations particulières pendant la mitose. En effet, nous avons tout d'abord retrouvé CHK1 phosphorylée en S280 au niveau des bras des chromosomes pendant la métaphase, comme décrit précédemment pour la protéine CHK1 totale (Peddibhotla et al., 2009), et nous avons également détecté CHK1 phosphorylée sur ce résidu au niveau du plan équatorial pendant l'anaphase ainsi qu'au midbody pendant la cytokinèse (Cartel et al., 2018).

Avec l'ensemble de ces données, CHK1 se révèle être fortement régulée tant au niveau de son activité, de son expression et de sa localisation. L'ensemble de ces régulations permettent à CHK1 d'agir correctement au cours du cycle cellulaire et d'effectuer l'ensemble de ses rôles que je vais maintenant décrire.

7. Rôles de CHK1 dans la régulation du cycle cellulaire

Essentiellement identifiée comme une protéine nécessaire à la mise en place des points de contrôle et de la réparation des dommages, CHK1 a plus récemment été identifiée comme importante pour le bon déroulement d'un cycle cellulaire normal, mais également dans la transcription et l'apoptose. L'ensemble de ses rôles seront décrits dans cette partie.

7.1. Le point de contrôle à la transition G1/S

En cas de dommages à l'ADN en phase G1 du cycle cellulaire, les voies ATM/CHK2 et ATR/CHK1 vont être activées et conduire à la phosphorylation de plusieurs substrats.

Parmi eux, **p53** a été décrit comme phosphorylée par CHK1 notamment sur les sérines 15, 20 et 37, modifiant la stabilité de p53. En effet, une étude montre que la surexpression de CHK1 augmente le niveau protéique de p53 avant et après radiation ionisante, et que des siARN dirigés contre CHK1 diminuent significativement le niveau de p53 (Sieh et al., 2000). Le résidu sérine 20 de p53 est particulièrement intéressant puisqu'il se situe dans le site d'interaction avec son ubiquitine ligase MDM2. La phosphorylation de ce site par CHK1 empêche l'ubiquitylation et la dégradation de p53 par MDM2. CHK1 est donc impliquée dans la régulation de la stabilité de p53, impactant la transcription de ses cibles telles que la protéine p21, qui inhibe les complexes CDK2-cycline E, causant l'arrêt du cycle en phase G1. Ceci a pour conséquence non seulement d'empêcher l'initiation de la réplication de l'ADN, mais permet également de conserver la voie Rb/E2F active pour limiter la croissance cellulaire et maintenir les cellules en phase G1.

En fin de phase G1, une voie de signalisation plus rapide impliquant **CDC25A** peut permettre l'arrêt du cycle. En effet, en absence de stress cellulaire, CHK1 phosphoryle de manière modérée CDC25A afin de maintenir un niveau approprié de cette phosphatase en induisant sa dégradation (Zhao et al., 2002 - Sørensen et al., 2003). En cas de stress cellulaire ou en réponse à des dommages, l'activité de CHK1 et la proportion de CDC25A phosphorylée augmentent. CDC25A est donc dégradée de manière plus

importante, entraînant l'inhibition des complexes CDK2-Cycline E et donc l'arrêt du cycle en fin de G1 (Donzelli et al., 2003). Ce mécanisme de régulation est plus rapide que celui impliquant p53 car il ne nécessite pas la transcription de protéines.

7.2. Le point de contrôle intra S : régulation de la réplication

L'étude de cellules déficientes pour CHK1 montre qu'elles subissent une entrée en mitose prématurée avec une phase S non terminée, démontrant un rôle majeur de CHK1 dans la régulation de la phase S du cycle.

a. La régulation de la phase S lors de dommages à l'ADN

Lors de dommages à l'ADN, CHK1 va en effet permettre le contrôle de l'activation de nouvelles origines de réplication et leur élongation, la stabilisation des fourches, et enfin la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN.

Après dommages à l'ADN, CHK1 phosphoryle la protéine **CDC25A**, induisant sa dégradation et par conséquent l'inhibition de CDK2-Cycline A et l'arrêt en phase S (Mailand et al., 2000 - Sørensen et al., 2003 - Hassepass et al., 2003). En effet, la dégradation de CDC25A entraîne une diminution de l'activation de CDK2, bloquant le recrutement de CDC45 à la chromatine, normalement nécessaire pour la mise en place des origines de réplication, induisant ainsi un ralentissement de la réplication (Arata et al., 2000 - Liu et al., 2006b - Gonzalez Besteiro et al., 2015). CHK1 est également capable de phosphoryler directement **CDC45** pour limiter la réplication (Liu et al., 2006b). C'est *via* ces fonctions que la voie ATR/CHK1 exerce un contrôle rapide du cycle cellulaire en intra S, en bloquant les fourches de réplication et en évitant leur élongation et l'activation de nouvelles origines lors d'un état de stress réplcatif.

Lorsque ces fourches de réplication sont bloquées, leur effondrement est un risque. CHK1 est alors indispensable pour stabiliser ces fourches, en les protégeant des nucléases telles que Mus81, pour permettre une bonne reprise de la réplication et de la progression du cycle cellulaire une fois le point de contrôle levé (Formont et al., 2011).

Après cette mise en place du point de contrôle et la stabilisation des fourches, CHK1 va alors initier la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN.

Un des mécanismes mis en place par CHK1 pour permettre la réponse aux dommages, est de faciliter la monoubiquitylation de **PCNA** *via* la Claspin et Rad18, pour permettre à PCNA d'effectuer la synthèse trans-lésionnelle, un procédé permettant à la machinerie de réplication de passer outre les dommages, ou de les tolérer pour la réplication (Yang et al., 2008). D'autre part, pour permettre la réparation des dommages, CHK1 peut phosphoryler la protéine **FANCE**, induisant la localisation de FANCE aux sites de dommages pour la mise en place des mécanismes de réparation médiés par la voie de signalisation BRCA (Wang et al., 2007). CHK1 peut également permettre la réparation par recombinaison homologue, en phosphorylant **Rad51** sur la sérine 309, permettant son recrutement aux sites de

dommages afin de promouvoir la réparation et la survie cellulaire (Sørensen et al., 2005). Enfin, en réponse à des cassures doubles brins, CHK1 peut phosphoryler la kinase **TLK** (tousled-like kinase), impliquée dans le remodelage de la chromatine, la réplication de l'ADN et la réparation (Groth et al., 2003), ainsi que les kinases **DNA-PK**, qui forment un complexe avec Ku70 et Ku80 important pour la réparation de ces cassures (Goudelock et al., 2003).

L'ensemble des fonctions de CHK1 décrites dans cette partie sont résumées dans la figure 9 ci-dessous.

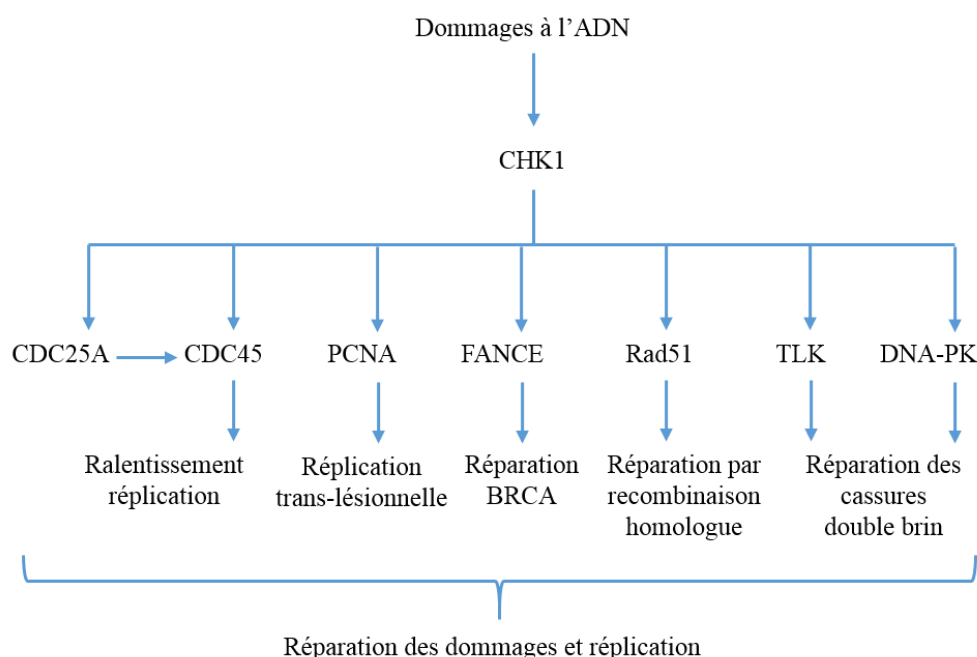


Figure 9 : La réparation des dommages à l'ADN médiée par CHK1. En réponse à des dommages à l'ADN, CHK1 est capable de phosphoryler de nombreux substrats pour permettre le ralentissement de la réplication et la réparation de ces dommages. Ainsi CHK1 permettra la bonne poursuite de la réplication. Adapté de Patil et al., 2013.

b. La régulation de la phase S lors d'un cycle cellulaire non perturbé

Dans des conditions non perturbées, les cellules ont besoin de CHK1 pour une croissance normale. En effet, des études indiquent que l'invalidation par siARN spécifiques ou l'inhibition pharmacologique de CHK1 augmentent l'initiation de la réplication de l'ADN, et induisent une accumulation de dommages à l'ADN et de phosphorylations de H2AX, ainsi qu'une perturbation de la mise en place de la réponse face à ces dommages (Syljuåsen et al, 2005).

En effet, CHK1 a été identifiée comme interagissant avec la protéine **Treslin** permettant la régulation de la réplication dans un cycle cellulaire non-perturbé. Grâce à cette interaction, CHK1 va réguler négativement l'implication de la Treslin dans l'initiation de la réplication, en empêchant le recrutement

de CDC45 à la chromatine (Guo et al., 2015). *Via* ce mécanisme, **l'initiation de la réplication est limitée par CHK1 au cours d'un cycle cellulaire normal.**

Très récemment, plusieurs études ont de nouveau mis en évidence le rôle de CHK1 dans la régulation lors d'un cycle cellulaire non perturbé.

Dans une première étude, Moiseeva et ses collaborateurs montrent que l'inhibition des kinases ATR et CHK1 induit l'activation des origines dormantes aux sites de réplication en cours. En effet, lors d'un cycle cellulaire non perturbé, CHK1 supprime l'activité de la kinase **CDK1** tout au long de la phase S et permet de stabiliser l'interaction entre RIF1 et PP1. Ce dernier va alors déphosphoryler les kinases CDC7 et CDK2 afin **d'inhiber le recrutement et l'activation des hélicases** pour la réplication. Ce mécanisme **limite donc le démarrage des origines au cours de la réplication de l'ADN lors d'un cycle cellulaire non perturbé** (Moiseeva et al., 2019).

Dans une seconde étude, Halder et ses collaborateurs mettent en évidence que CHK1 peut phosphoryler la metallo-protéase **SPRTN**, essentielle dans la réplication de l'ADN. Cette phosphorylation dans le domaine régulateur C-terminal de SPRTN stimule son recrutement à la chromatine, permettant **la progression des fourches de réplication** (Halder et al., 2019).

Enfin, CHK1 a été également décrit comme **impliquée dans l'activation de la réplication de manière indirecte**. Les facteurs de transcription **E2F7 et E2F8** (membres de la famille E2F), sont de puissants répresseurs transcriptionnels des gènes de la réplication de l'ADN, ayant la possibilité d'induire de cette manière, un arrêt permanent de la phase S. Dans une étude récente, les auteurs montrent que ces facteurs E2F7/8 peuvent être phosphorylés directement par CHK1 afin d'éviter l'arrêt permanent du cycle cellulaire. Ce mécanisme nécessite la protéine 14-3-3, qui, après phosphorylation des E2F7/8 par CHK1, se retrouve recrutée au niveau des promoteurs des gènes cibles de ces facteurs de transcription et semble interférer avec leur activité répresseur. Ainsi, cette étude révèle que CHK1 et la protéine 14-3-3 coopèrent pour inactiver les fonctions de répresseur transcriptionnel de ces facteurs E2F atypiques (Yuan et al., 2018).

7.3. Le point de contrôle G2/M

Dès les premiers travaux sur CHK1 en 1993, Walworth et ses collaborateurs ont déterminé que la surexpression de CHK1 seule suffit pour entraîner l'arrêt du cycle en G2/M, suggérant un rôle majeur de cette kinase pour la mise en place de ce point de contrôle (Walworth et al., 1993).

Ce point de contrôle est crucial puisqu'il empêche les cellules d'entrer en mitose si elles ont subi une réplication incomplète ou inappropriée, si des dommages sont apparus en phase G2 ou si des dommages ont persistés depuis la phase G1 ou S.

CHK1 permet en fait l'arrêt du cycle dans cette phase *via* les phosphorylations inhibitrices des phosphatases **CDC25** et la phosphorylation activatrice de la kinase **Wee1** causant l'inhibition de **CDK1-Cycline B**, et induisant l'arrêt à la transition G2/M du cycle cellulaire (O'Connell et al., 1997 - Rundle et al., 2017 – Patil et al., 2013 – Zhang et al., 2014b). Ce point de contrôle prévient ainsi l'entrée d'une cellule non préparée en mitose, évitant ainsi l'apparition éventuelle de catastrophes mitotiques.

Pour clarifier le rôle de CHK1 dans un cycle cellulaire non perturbé, Goto et ses collaborateurs ont mis au point, grâce à la technologie CRISPR/Cas9, une lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal (HCT116) où une dégradation rapide et spécifique de CHK1 dépendante de l'auxin (IAA) peut être induite. Cette dégradation rapide permet ainsi de distinguer les voies directement impactées par la perte de CHK1. Grâce à cette technique, les auteurs ont pu mettre en évidence que cette dégradation de CHK1 entraîne dans un premier temps une stabilisation de la protéine CDC25A dès 2-4 h d'induction. Une accumulation de protéines des dommages à l'ADN telles que γ H2AX est ensuite observée après 20-24 h d'induction, puis une stabilisation de p53 ainsi qu'un **arrêt du cycle cellulaire en G2 /M**, sans augmentation majeure de l'apoptose. De manière intéressante, le phénotype associé à la perte de CHK1 est partiellement restauré par la déplétion de CDC25A dans ces mêmes cellules, suggérant donc un **rôle de CHK1 dans un cycle cellulaire non perturbé** et en absence de dommages à l'ADN exogènes, **principalement en ciblant CDC25A** (Goto et al., 2019).

Enfin, pour permettre la transition G2/M dans un cycle normal ou après réparation des dommages, CHK1 doit être inactivée pour permettre la levée du point de contrôle. Ceci peut être tout d'abord réalisé par PLK1, qui va phosphoryler la Claspine, médiateur clé de l'activation de CHK1, entraînant sa dégradation et donc l'inactivation de CHK1 (Mailand et al., 2006 – Peschiaroli et al., 2006). Un deuxième mécanisme de régulation possible est l'augmentation rapide de l'activité de CDK1/Cycline B à la fin de la phase G2, qui conduit à la phosphorylation de CHK1 sur les sérines 286 et 301, la relocalisant dans le cytoplasme comme décrit précédemment (Shiromizu et al., 2006 – Enomoto et al., 2009). Ces résultats suggèrent que l'activité de CHK1 est finement régulée pour assurer une progression correcte vers la mitose (Zhang et al., 2014b).

La kinase CHK1 intervient donc dans la mise en place des points de contrôle tout au long de l'interphase du cycle cellulaire *via* différents partenaires (Figure 10).

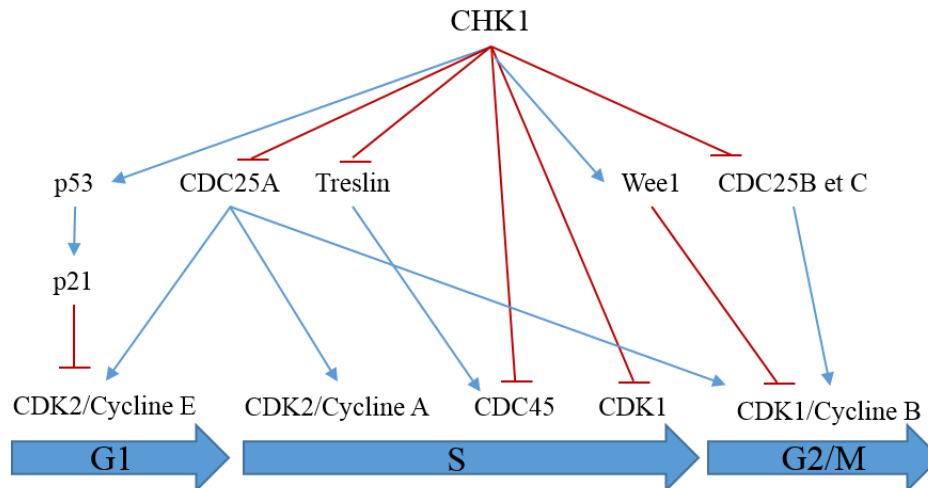


Figure 10 : Représentation schématique des différents mécanismes de régulation de l'interphase par CHK1. Tout au long de l'interphase, CHK1 va réguler différents substrats, positivement ou négativement, afin d'assurer le bon déroulement de l'interphase *via* les points de contrôle.

7.4. Contrôle de la mitose

En plus de son rôle dans la régulation de la réplication de l'ADN, des rapports récents ont démontré l'implication de CHK1 lors de la mitose. En effet, l'haplo-insuffisance de CHK1 dans des souris entraîne plusieurs défauts mitotiques tels qu'un défaut de fonction des kinétochores, et l'apparition de cellules binucléées et de catastrophes mitotiques (Peddibhotla et al., 2009).

a. Contrôle de l'entrée en mitose

Un des premiers événements permettant l'entrée des cellules en mitose est l'activation du complexe CDK1-Cycline B1 au niveau des centrosomes grâce à CDC25B. Ainsi, dès l'interphase d'un cycle cellulaire normal, CHK1 va bloquer l'entrée anticipée des cellules en mitose en phosphorylant **CDC25B**. Cette phosphorylation va limiter l'activité de CDC25B au centrosome, empêchant l'activation de CDK1 (Krämer et al., 2004 - Schmitt et al., 2006). De manière similaire, en cas de dommages à l'ADN, CHK1 va phosphoryler **Aurora B** dès la phase S, pour limiter son activation et prévenir l'entrée en mitose (Zuazua-Villar et al., 2014). De plus, **PP2A** peut également être une cible en aval de CHK1 pour contrôler l'entrée en mitose suite à des dommages de l'ADN. PP2A peut en effet déphosphoryler la kinase mitotique PLK1 (Polo Like Kinase 1) en aval de la voie de signalisation impliquant CHK1, induisant une accumulation des cellules en phase G2 afin de bloquer l'entrée en mitose (Lee et al., 2010a).

b. Contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique

Au début de la mitose, au cours de la prométaphase, **Aurora B** est une kinase essentielle pour déceler les attachements défectueux des microtubules aux centromères. Dans le cas d'un attachement

défectueux, Aurora B va accéder à ses substrats kinétochoriens tels que BubR1, afin d'activer le point de contrôle de l'assemblage mitotique, aussi appelé « Spindle Assembly Checkpoint ». CHK1 a été décrite comme phosphorylant Aurora B sur la sérine 331, permettant son activation complète, et assurant le bon déroulement de la prométaphase (Petsalaki et al., 2011 - Zachos et al., 2007). De plus, l'invalidation de CHK1 dans des cellules mitotiques induit une localisation anormale d'Aurora B (Peddibhotla et al., 2009)

CHK1 est également impliquée dans la transition métaphase-anaphase, et dans le bon alignement des chromosomes sur le plan équatorial, en régulant positivement le niveau et la localisation subcellulaire de **Cdc20** et **MAD2** (Yang et al., 2014), et en régulant négativement **PLK1** afin d'inactiver le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (Tang et al., 2006). Ceci permet la progression de la mitose.

Enfin, lors de la cytokinèse, étape terminale de la mitose donnant les deux cellules filles, CHK1 joue également un rôle majeur. En effet, l'invalidation de CHK1 dans des cellules d'ostéosarcome U2OS entraîne une augmentation du pourcentage de cellules polynucléées (ayant un contenu en ADN de 4N ou plus). De manière intéressante, la déplétion de CHK1 dans ces cellules n'induit pas de modification du nombre de cellules en phase G2 ou en mitose, mais induit une accumulation des cellules dans les dernières étapes de la cytokinèse, et l'apparition de cellules tétraploïdes en G1, avec une diminution du niveau des protéines du point de contrôle de l'assemblage mitotique Mad2 et BubR1 (Carrassa et al., 2009). Une autre étude montre le rôle de CHK1 à cette étape de la mitose, puisque l'invalidation de CHK1 dans des cellules mitotiques conduit à la régression de la cytokinèse et à l'apparition de cellules binucléées (Peddibhotla et al., 2009).

L'ensemble de ces études fournissent la preuve de l'existence de fonctions de CHK1 durant la mitose, indépendamment de dommages à l'ADN. Cependant, beaucoup de questions persistent concernant les mécanismes précis et l'identité des cibles moléculaires ciblées par CHK1.

Au cours de ma thèse, j'ai contribué à une meilleure compréhension du rôle de CHK1 en mitose, indépendamment de la réponse aux dommages à l'ADN, en participant à l'avancée du projet de recherche mené par ma co-directrice de thèse Christine Didier. Dans ce travail, nous avons mis en évidence que la kinase **PLK1** est une cible directe de CHK1 au cours de la mitose, en démontrant que l'invalidation ou l'inhibition de CHK1 diminue la phosphorylation activatrice sur la T210 de PLK1, et que ceci impacte la stabilité des substrats de PLK1. De manière intéressante, la phosphorylation de PLK1 par CHK1 nécessite la phosphorylation préalable de CHK1 en S280 par la kinase PIM2. Par des approches de microscopie à fluorescence, nous avons montré que CHK1 phosphorylée en S280 et PLK1 sont localisées dans les mêmes compartiments spécifiques en mitose, et co-immunoprécipitent dans des extraits cellulaires mitotiques. Enfin, l'inhibition des kinases PIM1 et PIM2 réduit la prolifération des cellules en bloquant l'entrée en mitose, mais cet effet est restauré par l'expression d'une forme constitutivement active de PLK1 (mutant constitutivement phosphorylé T210D). **L'ensemble de ce**

travail met en évidence un nouveau rôle de CHK1 indépendamment de la réponse aux dommages à l'ADN, en mettant en lumière une nouvelle cascade de phosphorylation entre les kinases PIM/CHK1/PLK1 et leur importance dans la régulation de la progression en mitose. Ce travail a été publié en août 2018 dans « Journal of Cell Science », et mon travail pendant la période de révision du papier m'a permis d'être co-premier auteur de cet article (Cartel M. et al., 2018). L'article complet est disponible dans la deuxième partie des résultats de ce manuscrit.

8. Autres rôles de CHK1

8.1. Rôle dans l'apoptose

Un des médiateurs clés de l'apoptose est le facteur de transcription p53. **p53** peut être phosphorylée par CHK1 sur la sérine 20, permettant de stabiliser p53 et par conséquent induire l'apoptose (Shieh et al., 2000). CHK1 et CHK2 peuvent également phosphoryler p53 sur d'autres résidus, la sérine 366 et la thréonine 387, en réponse à des dommages à l'ADN. L'utilisation de siARN dirigés contre CHK1 et CHK2 diminue la phosphorylation sur ces deux sites de phosphorylation de p53 et aboutit à la diminution du niveau de deux cibles en aval de p53, que sont p21 et Bax (Ou et al., 2005).

CHK1 peut également supprimer l'apoptose dépendante des **caspases 2 et des caspases 3**, en réponse à des dommages ou à un stress réplicatif, indépendamment de p53 et Bcl-2, protégeant les cellules de la mort (Myers et al., 2009 – Sidi et al., 2008). Ainsi, l'inhibition de CHK1 favorise l'induction de la mort cellulaire par apoptose, dépendamment ou indépendamment de p53.

Enfin, une étude rapporte que CHK1 peut être clivée par les caspases, donnant une forme tronquée de CHK1 possédant seulement son domaine N-terminal (acides aminés 1-299), favorisant son activité catalytique (Matsuura et al., 2008).

8.2. Rôle transcriptionnel

CHK1 a également été identifiée comme impliquée dans la régulation de la transcription. En voulant étudier les mécanismes de régulation de la transcription en réponse à des dommages à l'ADN, Shimada et ses collaborateurs ont mis en évidence que la phosphorylation en **thréonine 11 de l'histone H3** était rapidement diminuée en réponse à des dommages, induisant une diminution de la transcription des gènes codant pour la Cycline B1 et CDK1. La kinase CHK1 est en fait responsable de cette phosphorylation au cours du cycle cellulaire, et en réponse à des dommages, CHK1 se dissocie rapidement de la chromatine, comme expliqué précédemment dans cette introduction. De façon concomitante à cette dissociation de CHK1, une diminution de la phosphorylation de l'histone H3 est observée. Cette perte de phosphorylation corrèle avec une réduction de liaison de l'histone acétyltransférase GCN5, induisant une diminution de l'acétylation de l'histone H3 sur la lysine 9, provoquant par conséquent une diminution de la transcription des gènes cibles impliqués dans la progression du cycle cellulaire, notamment la Cycline B1 et CDK1. Ainsi, CHK1 apparaît comme une

kinase régulant la phosphorylation de l'histone H3, et en réponse à des dommages à l'ADN, CHK1 perd ce rôle d'activateur transcriptionnel en étant relarguée de la chromatine (Shimada et al., 2008).

Très récemment, grâce à une étude par spectrométrie de masse, la sous-unité p50 du facteur de transcription NF- κ B a été identifiée comme phosphorylée par CHK1 sur les résidus sérine 65, 152, 242 et 248. De plus, un phosphomimétique S242D révèle avoir une affinité à l'ADN réduite par 10 (Vonderach et al., 2019). Ainsi CHK1 pourrait réguler l'activité transcriptionnelle de NF- κ B.

Par ailleurs, lors de la transition G1/S d'un cycle cellulaire normal, le **répresseur transcriptionnel E2F6** prend la place du facteur de transcription E2F au niveau de ses promoteurs, dans le but de réprimer la transcription des gènes de la phase G1 et de permettre la progression dans la phase S. En réponse à un stress réplcatif, CHK1 va phosphoryler E2F6, conduisant à sa dissociation des promoteurs. De cette manière, CHK1 favorise la transcription dépendante du facteur de transcription E2F, permettant à la cellule de faire face au stress réplcatif en prévenant les dommages et la mort cellulaire (Bertoli et al., 2013).

Ainsi, en régulant la transcription, CHK1 contrôle, à un autre niveau, le cycle cellulaire.

La kinase CHK1 agit donc comme un agent double, permettant la régulation du cycle cellulaire en condition normale ou en condition perturbée en ayant des rôles variés (Figure 11).

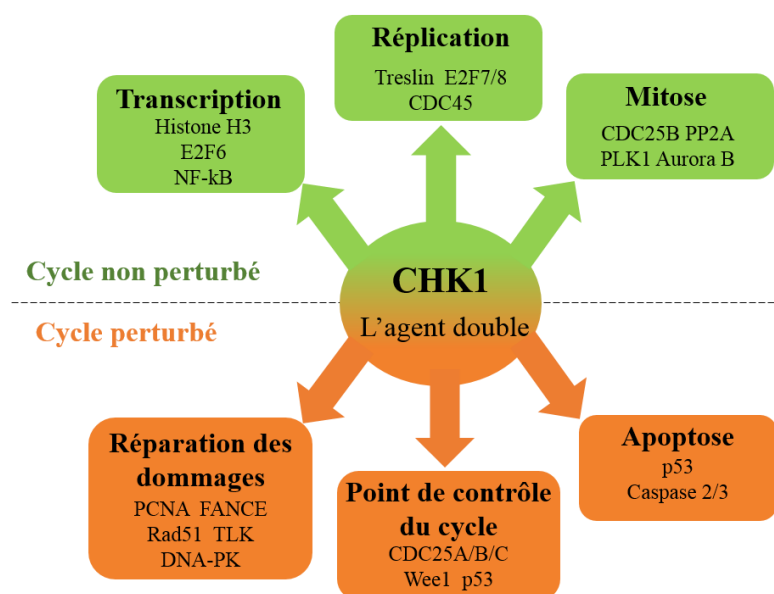


Figure 11 : Résumé des fonctions de CHK1 dans un cycle cellulaire perturbé ou non, avec ses cibles associées. En fonction du contexte, CHK1 a la capacité de réguler différents substrats impliqués dans des processus cellulaires variés, permettant la régulation du cycle cellulaire en condition normale ou perturbée.

Le stress réplcatif et l'instabilité génétique font partie des caractéristiques principales qui définissent la tumorigenèse (Hanahan et al., 2011 - Luo et al., 2009). Au vue de l'importance de

CHK1 dans la régulation du cycle cellulaire pour protéger les cellules de cette instabilité, la question du lien entre CHK1 et les cancers peut être posée.

III. Rôles de CHK1 dans la tumorigenèse et les cancers

1. Dérégulations de CHK1 dans les cancers et son implication

Au vu de son rôle primordial dans la réponse aux dommages de l'ADN, CHK1 a d'abord été imaginée comme un suppresseur de tumeur, et de nombreux efforts ont été menés afin d'identifier des mutations de CHK1 dans les cancers. Pourtant, peu d'amplifications ou de délétions ont été décrites à ce jour, mais de nombreuses dérégulations des niveaux de l'ARNm ou de la protéine CHK1 sont reportés dans les cancers, laissant supposer l'importance de CHK1 et de sa régulation dans la tumorigenèse.

1.1. Un faible niveau de CHK1

La protéine CHK1 est retrouvée très peu mutée et aucune mutation héréditaire n'a pu être identifiée dans les cancers, et ce, contrairement à d'autres acteurs des points de contrôle et de réparation des dommages de l'ADN, tels que p53, CHK2 ou BRCA1. Quelques modifications ont tout de même été identifiées, avec notamment une mutation de CHK1 due à des changements du cadre de lecture dans des cancers du côlon et de l'endomètre (Bertoni et al., 1999 – Kim et al., 2007), ou encore dans les cancers de l'estomac mais avec une faible fréquence (dans 9% des tumeurs analysées de l'étude) (Menoyo et al., 2001). Cependant, l'impact cellulaire de ces formes tronquées n'a pas encore été défini. D'autre part, une délétion du chromosome 11q24, contenant le locus de CHK1, a été retrouvée dans les cancers du sein, avec l'amplification en parallèle du locus de la cycline D1, contribuant à la résistance au traitement (Lundgren et al., 2008).

De plus, l'expression de CHK1 est retrouvée diminuée dans différents cancers sans mutation ou délétion. En effet, dans certaines Leucémies Aiguës Lymphoblastiques, l'expression de CHK1 est retrouvée diminuée du fait de la surexpression du répresseur transcriptionnel TLX1 (T cell leukemia homeobox protein 1), induisant une perte du point de contrôle mitotique (De Keersmaecker et al., 2010). De manière similaire dans les cancers de la prostate, les facteurs de transcription de la famille des ETS sont souvent retrouvés surexprimés, induisant une diminution du niveau de CHK1 et une accumulation de dommages à l'ADN causant une instabilité génétique (Lunardi et al., 2015). Enfin, CHK1 est retrouvée sous-exprimée dans certains syndromes myélodysplasiques (Pellagatti et al., 2010). Cette sous-expression de CHK1 pourrait contribuer à l'évolution du cancer en provoquant une instabilité génomique. En effet, il a été montré que l'haplo-insuffisance de CHK1 dans des modèles de souris provoquait une mauvaise coordination de la progression du cycle cellulaire, avec des chevauchements de la réplication et de la mitose où des cellules présentent un phénotype de mitose lors de la phase S, conduisant à un état d'instabilité génétique favorisant la transformation tumorale (Lam et al., 2004). Ainsi, une diminution du niveau de CHK1 dans les cancers comme décrit ici en aval de TLX1 ou des

facteurs de la famille ETS, peut conduire à une instabilité génétique et à la tumorigenèse. CHK1 agirait donc comme un garant de la stabilité génétique et lutterait contre l'apparition des tumeurs.

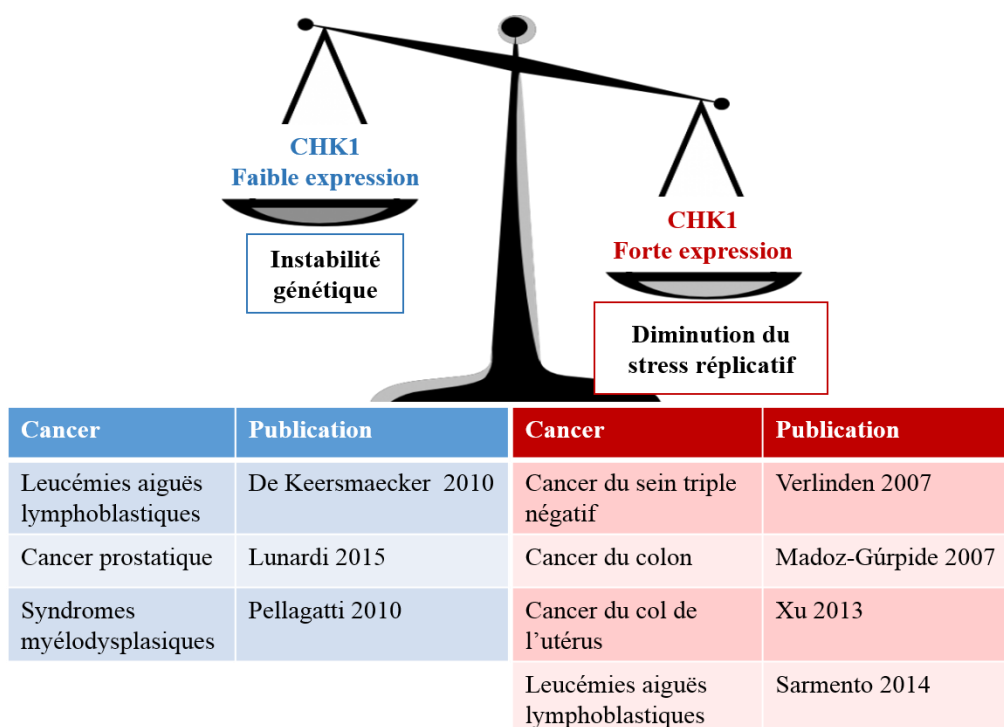
Pourtant, d'autres études vont à l'encontre de cette hypothèse, puisque la délétion conditionnelle de CHK1 seule dans les glandes mammaires de souris n'augmente pas l'apparition de tumeurs spontanées, malgré un développement anormal des glandes mammaires. De plus, l'inhibition ou la perte complète de CHK1 (par shARN) induit la mort des cellules tumorales mammaires (Fishler et al., 2010). Une autre étude va dans ce sens, où les auteurs ont mis en évidence qu'une perte complète de CHK1 est incompatible avec la tumorigenèse épithéliale, tandis que la perte partielle par haplo-insuffisance favorise la progression des tumeurs bénignes (Tho et al., 2012).

1.2. Un fort niveau de CHK1

Comme pour la sous-expression de CHK1, peu de modifications génétiques sont retrouvés pour la surexpression de CHK1, et des amplifications de CHK1 sont retrouvées en particulier dans les cancers ovariens, du rein, de la thyroïde et dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes (Krajewska et al., 2015).

Par ailleurs, CHK1 est surexprimée dans de nombreux cancers : cancer du sein triple négatif (Verlinden et al., 2007), cancer du côlon (Madoz-Gurpide et al., 2007), cancer du col de l'utérus (Xu et al., 2013), et dans les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (Sarmiento et al., 2014), en comparaison au tissu sain, et cette expression de CHK1 est souvent corrélée avec le grade tumoral et la rechute. De plus, des études mettent en avant un rôle de CHK1 dans la croissance tumorale. En effet l'expression d'une copie supplémentaire de CHK1 favorise la transformation des cellules chez la souris. D'autre part, lorsque le processus de tumorigenèse est lancé, un fort niveau de CHK1 semble important pour la survie des cellules cancéreuses, en permettant de lutter contre le stress réplicatif et de contrebalancer l'effet néfaste, pour permettre la transformation et la survie des cellules tumorales (Lopez-Contreras et al., 2012).

Qu'elle soit surexprimée ou sous-exprimée, CHK1 semble donc jouer un rôle important dans les tumeurs. En effet, il semblerait que CHK1 nécessite d'être présente à un niveau d'expression « normal », comme à l'équilibre d'une balance, pour éviter la progression tumorale (Figure 12).



Figure

12 :

Expression de CHK1 dans les cancers. CHK1 est retrouvée exprimée de manière hétérogène entre les différents types de cancers. La faible expression ou la forte expression de CHK1 apportent un avantage à la cellule tumorale, soit en favorisant l'instabilité génétique, soit en protégeant les cellules du stress réplicatif.

2. Intérêt du ciblage de CHK1 dans les cancers

Plusieurs études montrent également que CHK1 contribue à la résistance au traitement de chimiothérapie ou radiothérapie, notamment dans les glioblastomes (Bao et al., 2006), les cancers de la prostate (Wang et al., 2012b), du sein (Zhang et al., 2009), du poumon non à petites cellules (Bartucci et al., 2012) et également dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes (David et al., 2016). En effet, face à des dommages à l'ADN induits par chimiothérapie, CHK1 va permettre une réparation de ces dommages, et ainsi diminuer le stress réplicatif et favoriser la survie de ces cellules. De manière intéressante, l'inhibition pharmacologique ou l'invalidation de CHK1 par siARN reverse certaines résistances, en permettant l'inhibition de la réparation des dommages à l'ADN induite par la chimiothérapie, en modifiant la régulation des fourches de réplication, en promouvant l'entrée précoce en mitose et en augmentant l'apoptose de ces cellules (Bao et al., 2006 - Wang et al., 2012b - Bartucci et al., 2012 - David et al., 2016 – Cai et al., 2019).

Ces études mettent en lumière un rôle essentiel de CHK1 pour la viabilité de ces cellules et la résistance au traitement. Ainsi, il semblerait que les cellules tumorales ayant un fort niveau de CHK1 possèderaient un avantage en terme de survie, en gérant le stress causé notamment par les dommages à l'ADN, le microenvironnement tumoral ou les chimiothérapies.

Toutes ces études confirment l'intérêt de cibler CHK1 dans les cancers possédant un fort niveau de CHK1 et résistants aux chimiothérapies.

3. Utilisation d'inhibiteur de CHK1

Afin de pouvoir cibler CHK1, de nombreux travaux ont été réalisés par des compagnies pharmaceutiques afin d'identifier des inhibiteurs de CHK1.

Les premiers inhibiteurs de CHK1 ayant été évalués en clinique (UCN-01, CBP-501, et XL-844) se sont révélés peu sélectifs et ayant de nombreux effets non spécifiques (Fuse et al., 1998 - Chamoun et al., 2018). Par conséquent plusieurs autres inhibiteurs de CHK1 ont été développés (Tableau 1).

Tableau 1 : Liste des inhibiteurs de CHK1 et leurs IC₅₀ pour cibler CHK1 et CHK2. D'après Chamoun et al., 2018.

Inhibiteur	IC ₅₀ pour CHK1	IC ₅₀ CHK2	Autres cibles
SB-218078	15nM	Non rapportée	
PD407824	47nM	Non rapportée	Wee1
PD321852	5nM	Non rapportée	
SCH-900776 (ou MK-8776)	3 nM	1500 nM	CDK2
LY2603618	7 nM	>1000 nM	
PF-00477736	0.49 nM	47 nM	VEGFR2, Fms, YES
AZD7762	5 nM	<10 nM	
LY2606368	0.9 nM	8 nM	RSK
SRA737	1.4 nM	1850 nM	

L'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre CHK1 est aujourd'hui testée et développée en clinique, aussi bien en monothérapie qu'en combinaison avec des chimiothérapies. L'ensemble des essais cliniques peut être retrouvé sur le site Clinical Trial à l'adresse : <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=CHK1&term=&cntry=&state=&city=&dist=>

a. CHK1 en monothérapie

L'inhibition de CHK1 est peu utilisée en monothérapie, et l'ensemble des études actuelles sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste des inhibiteurs actuellement en essai clinique en monothérapie. D'après les données disponibles sur Clinical Trial.

Composé	Phase	Modèle
LY2606368 (Prexasertib)	Phase I active	Tumeurs solides avec métastases
	Phase I en recrutement	Tumeurs solides pédiatriques
		Tumeurs avec déficience de la réparation homologue ou avec stress réplicatif
	Phase I complétée	Cancer avancé, tête et cou
	Phase II en recrutement	Cancer Ovaire-sein-prostate
	Phase II active	Cancer Ovaire
	Phase II complétée	Cancer du poumon à petite cellule
SRA737	Phase I/II active	Tumeurs solides avancées ou lymphomes non Hodgkinnien

b. En association avec de la chimiothérapie

La chimiothérapie et la radiothérapie ont pour but de tuer les cellules cancéreuses proliférantes en induisant massivement des dommages dans leur ADN. La voie de réponse aux dommages dépendante de CHK1 est alors activée pour permettre la survie de ces cellules. L'idée est donc venue de combiner l'inhibition de CHK1 à la chimiothérapie pour que les cellules cancéreuses perdent leur capacité à répondre et à réparer les dommages de l'ADN, permettant la mort de ces cellules par létalité synthétique entre ces deux traitements. L'ensemble des études cliniques actuelles sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des inhibiteurs actuellement en essai clinique en combinaison avec de la chimiothérapie.
D'après les données disponibles sur Clinical Trial.

Composé	Phase	Modèle	Type de traitement
LY2606368 (Prexasertib)	Phase I recrutement en cours	Leucémies Aiguës Myéloïdes réfractaires	LY2606368 + cytarabine + etoposide + prexasertib
	Phase I active	Leucémies Aiguës Myéloïdes réfractaires	LY2606368 + Fludarabine + Cytarabine
		Cancer métastatique colorectal ou sein	LY2606368 + Cisplatine/ Cetuximab/Pemetrexed/5-FU/ LY3023414
	Phase II complétée	Cancer de la tête et du cou	LY2606368 + Cisplatine + Radiation Therapy
SCH-900776 (MK-8776)	Phase I terminée	Leucémies Aiguës Myéloïdes	SCH-900776 + cytarabine
		Lymphomes et tumeurs solides	SCH-900776 + gemcitabine
	Phase II complétée	Leucémies Aiguës Myéloïdes avec rechute	SCH-900776 + cytarabine
LY2603618	Phase I complétée	Tumeurs solides	LY2603618 + gemcitabine
		Cancers avancés	LY2603618 + pemetrexed + gemcitabine
		Cancers du pancréas	LY2603618 + gemcitabine
PF-00477736	Phase I (arrêtée)	Néoplasmes	PF-00477736 + gemcitabine
AZD7762	Phase I terminée	Cancers solides avancés	AZD7762 + gemcitabine
		Cancers solides avancés	AZD7762 + irinotecan
SRA737	Phase I/II recrutement en cours	Tumeurs solides avancées	SRA737 + gemcitabine + cisplatine

D'autres essais cliniques existent en combinaisons avec différents inhibiteurs (comme les inhibiteurs de PARP), mais ne seront pas présentés par souci de synthèse. L'ensemble des essais sont disponibles sur le site Clinical Trial.

Avec l'ensemble de cette étude bibliographique, CHK1 apparaît très clairement comme un régulateur important, à la fois dans un contexte dit "normal", en absence de stress génotoxique, pour contrôler le bon déroulement d'un cycle cellulaire, mais également en réponse au stress et dans les cancers. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs dans le traitement des cancers possédant un fort niveau de CHK1 et résistants aux chimiothérapies s'est révélée intéressante. Bien que les premières générations d'inhibiteurs de CHK1 n'aient pas permis d'obtenir de bénéfices thérapeutiques en combinaison avec la chimiothérapie, les recherches se poursuivent pour identifier de nouveaux inhibiteurs de CHK1, de nouvelles combinaisons, ainsi que les sous-types de cancers pour lesquels ce traitement serait efficace. De plus, l'étude des régulations de CHK1 dans les cancers nécessite d'être poursuivie pour tenter de comprendre comment CHK1 est régulée dans ces pathologies.

Au vu des rôles de CHK1 dépendants du contexte cellulaire, mes travaux de thèse ont porté sur les rôles de CHK1 dans l'hématopoïèse, à la fois dans un contexte de différenciation normale et dans un contexte leucémique. En effet, plusieurs études mettent déjà en avant un rôle de CHK1 dans l'hématopoïèse normale, mais des zones d'ombres persistent pour permettre une meilleure compréhension de l'importance de CHK1 dans la différenciation, notamment dans la voie mégacaryocytaire. Par ailleurs, CHK1 se révèle importante dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM), notamment dans la résistance à la chimiothérapie, et de nombreuses études cliniques tentent de cibler CHK1 dans ce contexte en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques. Pour permettre une meilleure compréhension de la biologie des LAM et comment cibler CHK1, il est aujourd'hui nécessaire de comprendre comment cette kinase est régulée dans ce contexte. Ces deux axes constituent mes deux projets de thèse, et seront introduits dans les deux parties suivantes de mon introduction.

Partie 2 : Rôle de CHK1 dans l'hématopoïèse normale et leucémique

I. L'hématopoïèse normale

1. [Définition et généralités](#)

L'hématopoïèse est le processus physiologique responsable de la formation des cellules sanguines, produites à partir de cellules souches pour constituer l'ensemble des cellules matures du sang. L'hématopoïèse est un processus crucial puisqu'il permet le maintien de l'homéostasie des cellules sanguines, en produisant approximativement 10^{12} cellules sanguines quotidiennement chez un adulte sain.

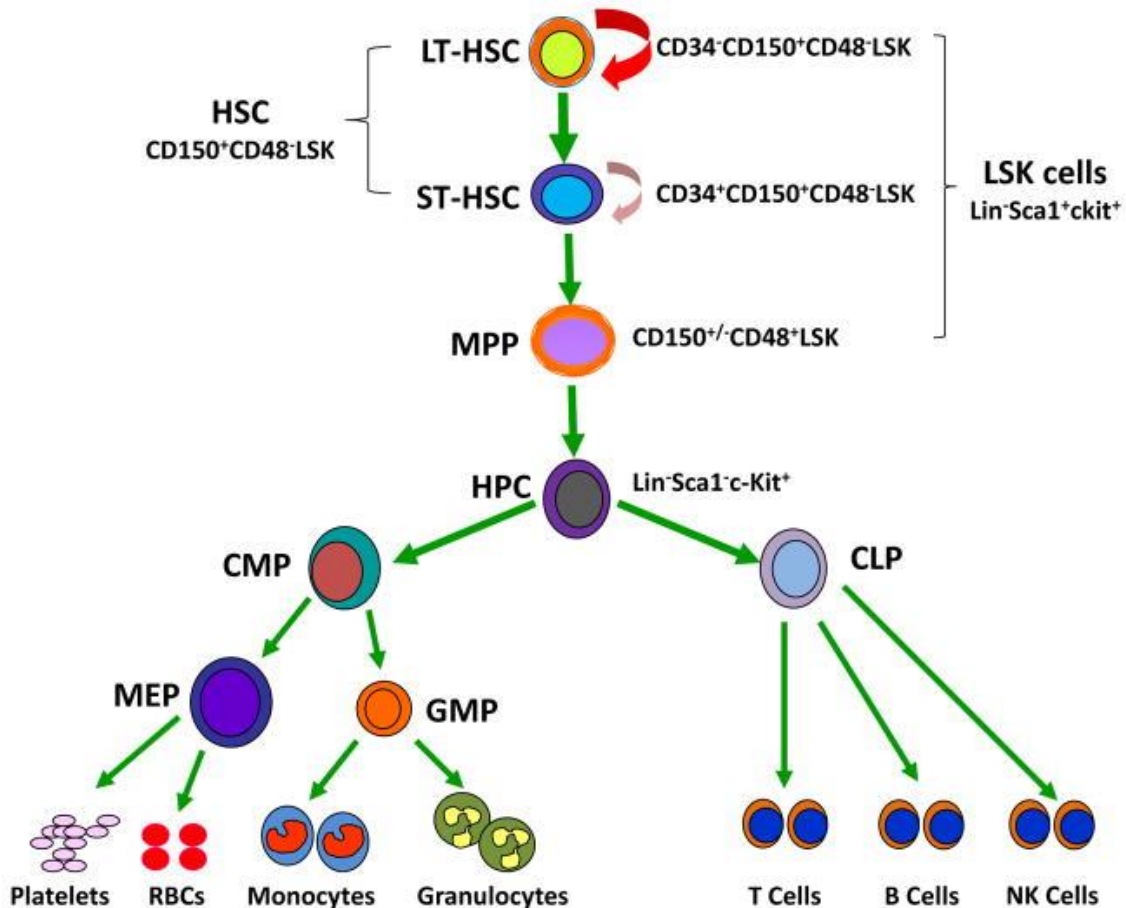
Pendant le développement embryonnaire des vertébrés, l'hématopoïèse commence dans le sac vitellin dès le jour 7,5 chez la souris, et pendant la troisième semaine de développement chez l'humain. L'hématopoïèse dans ce sac vitellin vise à produire les cellules sanguines essentielles à la survie, en commençant par les érythrocytes transportant l'oxygène, et les mégacaryocytes produisant les plaquettes (Tober et al., 2007 - Noetzli et al., 2019). Chez l'adulte, l'hématopoïèse se déroule essentiellement dans la moelle osseuse des os longs et des os plats. De nombreuses cellules non-hématopoïétiques sont présentes dans la moelle osseuse pour constituer un tissu de soutien au déroulement de l'hématopoïèse, grâce notamment aux fibroblastes et aux adipocytes, ainsi qu'un réseau de vaisseaux sanguins et de matrice extracellulaire. Cet ensemble forme la **niche hématopoïétique**.

2. [Déroulement de l'hématopoïèse](#)

Le système hématopoïétique fonctionne comme **une hiérarchie pyramidale**, organisée à partir d'une cellule souche hématopoïétique (HSC) qui se trouve au sommet, et qui est capable de s'auto-renouveler et de se différencier pour être à l'origine de toutes les cellules du système hématopoïétique (Figure 13). La première preuve de l'existence de ces HSC date de 1961, où Till et McCulloch ont découvert une population de cellules clonogéniques dans la moelle osseuse, qui, une fois transplantée dans un hôte secondaire irradié, était capable de générer des colonies myéloïdes (Till et McCulloch, 1961). Ces cellules sont aujourd'hui définies comme des cellules souches hématopoïétiques, avec un potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation, et sont caractérisées par l'immunophénotypage LIN⁻, CD34⁺, CD38⁻, Thy1⁺, CD45RA⁻ et CD117⁺ chez l'homme. Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques à long terme appelées LT-HSC (Long term-Hematopoietic Stem Cell), sont quiescentes, en phase G0 du cycle cellulaire avec une activité mitochondriale très basse, mais possèdent un fort potentiel d'auto-renouvellement. Ces cellules sont conservées tout au long de la vie de l'organisme. Lors de l'hématopoïèse classique, la division des LT-HSC entraîne l'apparition de nouvelle LT-HSC ou de cellules souches hématopoïétiques à court terme appelées ST-HSC (Short Term-Hematopoietic Stem Cell), capables de former tous les lignages hématopoïétiques matures, mais durant un temps limité d'environ 8 semaines. Ces cellules se différencient ensuite en progéniteurs multipotents

(MPP) pour se différencier en progéniteurs engagés dans un des lignages sanguins, donnant les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) ou les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) (Noetzli et al., 2019). Les CLP donnent naissance aux lymphocytes B et T ainsi qu'au *natural killer*, tandis que les CMP produisent les progéniteurs granulocytes-macrophages (GMP) ainsi que les progéniteurs mégacaryocyte-érythrocytes (MEP)(Figure 13)(Akashi et al., 2000 - Passégué et al., 2003).

Figure 13 : La hiérarchie hématopoïétique. Le système hématopoïétique est maintenu par des cellules souches hématopoïétiques (HSC) qui peuvent s'auto-renouveler et se subdiviser en un large spectre de cellules sanguines

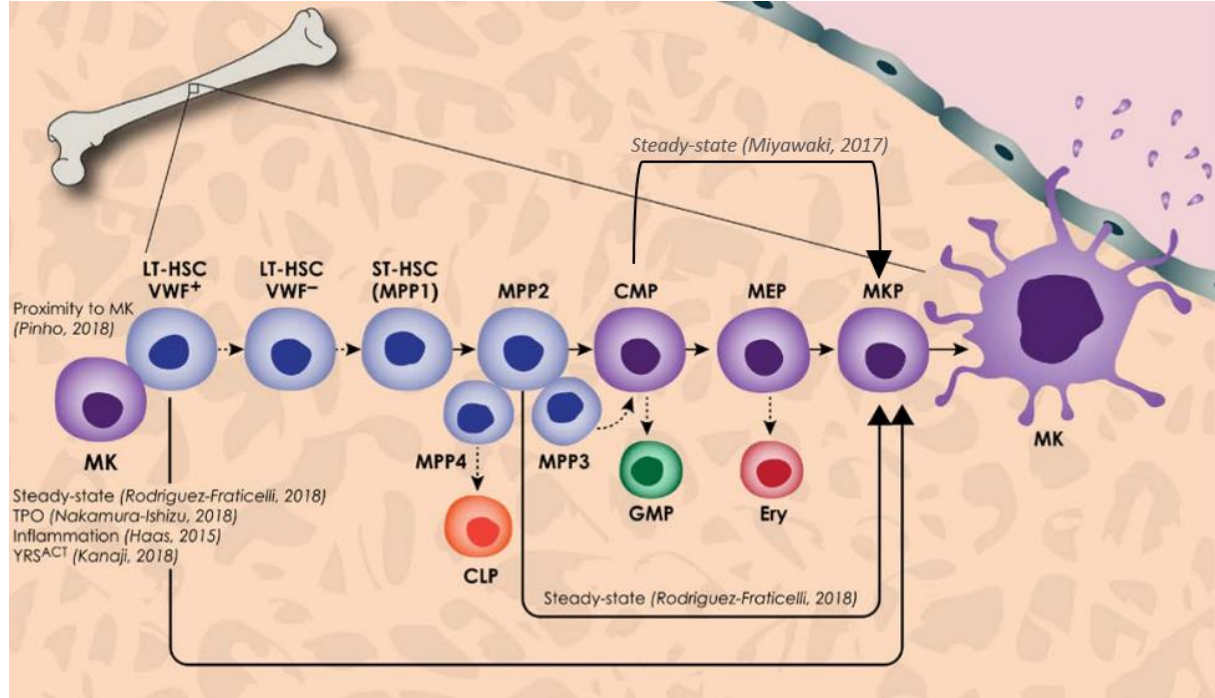


matures. Les capacités de repopulation des HSC sont à long terme (LT-HSC) ou à court terme (ST-HSC). Les HSC se divisent en progéniteurs hématopoïétiques ayant un fort potentiel prolifératif mais qui perdent leur capacité d'autorenouvellement. Ces progéniteurs multipotents (MPP) vont se différencier en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) ou en progéniteurs myéloïdes communs (CMP). Ces progéniteurs sont à l'origine du large spectre de cellules sanguines formées qui ne s'auto-renouvellent pas (à l'exception des cellules de la lignée lymphoïde) et qui composent le sang. D'après Shao et al., 2013.

Cependant, ce dogme de la hiérarchie hématopoïétique pyramidale et compartimentée en sens unique, semble ne pas être absolu et aurait une plasticité bien plus importante. Dans ce sens, de récents travaux ont montré qu'au moins une partie des cellules souches hématopoïétiques LT-HSC ainsi que des progéniteurs multipotents MPP et les progéniteurs myéloïdes communs CMP sont une source directe de mégacaryocytes. Ces cellules seraient en effet capables de contourner la voie des progéniteurs classiques, et ainsi réapprovisionner directement environ 30% de la population mégacaryocytaire, à

l'état basal (Miyawaki et al., 2017 - Rodriguez-Fraticelli et al., 2018), ou en réponse à une stimulation à la TPO (Nakamura-Ishizu et al., 2018) (Figure 14) (Noetzli et al., 2019).

Figure 14 : Modèle hématopoïétique de la différenciation des mégacaryocytes. La formation des mégacaryocytes implique plusieurs étapes de différenciation cellulaire initiées par les cellules souches hématopoïétiques à long terme (LT-HSC), puis les cellules souches hématopoïétiques à court terme (ST-HSC)



aussi appelées progéniteurs multipotents-1 (MPP1), donnant les progéniteurs multipotents-2 (MPP2), puis les progéniteurs myéloïdes communs (CMP). Ces progéniteurs myéloïdes communs pourront donner à la fois des progéniteurs granulocytes-macrophages (GMP) ainsi que les progéniteurs mégacaryocyte-érythrocytes (MEP). Enfin, ces MEP se différencieront en érythrocytes (Ery) ou en progéniteurs mégacaryocytes (MKP) pouvant former les mégacaryocytes (MK). De plus, les LT-HSC, les MPP2 et les CMP sont capables de se différencier directement en MK en passant outre les progéniteurs intermédiaires, aussi bien lors de l'hématopoïèse normale, que lors d'une stimulation à la TPO. Adapté de Noetzli et al., 2019.

3. Régulation de l'hématopoïèse

Dans le but de conserver un nombre correct de cellules souches fonctionnelles et de fournir un nombre suffisant de progéniteurs, l'hématopoïèse se doit d'être finement régulée. Des régulateurs transcriptionnels ainsi que des facteurs de croissance et leurs récepteurs sont donc exprimés de façon séquentielle et différentielle au cours du temps, permettant l'activation de voies de signalisation qui conditionnent la prolifération, la survie, et déterminent l'engagement des progéniteurs dans un lignage cellulaire (Zhu et Emerson, 2002).

En effet, plusieurs facteurs de transcription jouent des rôles primordiaux dans la régulation de l'hématopoïèse (Figure 15), et leur invalidation conduit à des arrêts de la différenciation à différents stades (Cantor et Orkin, 2002).

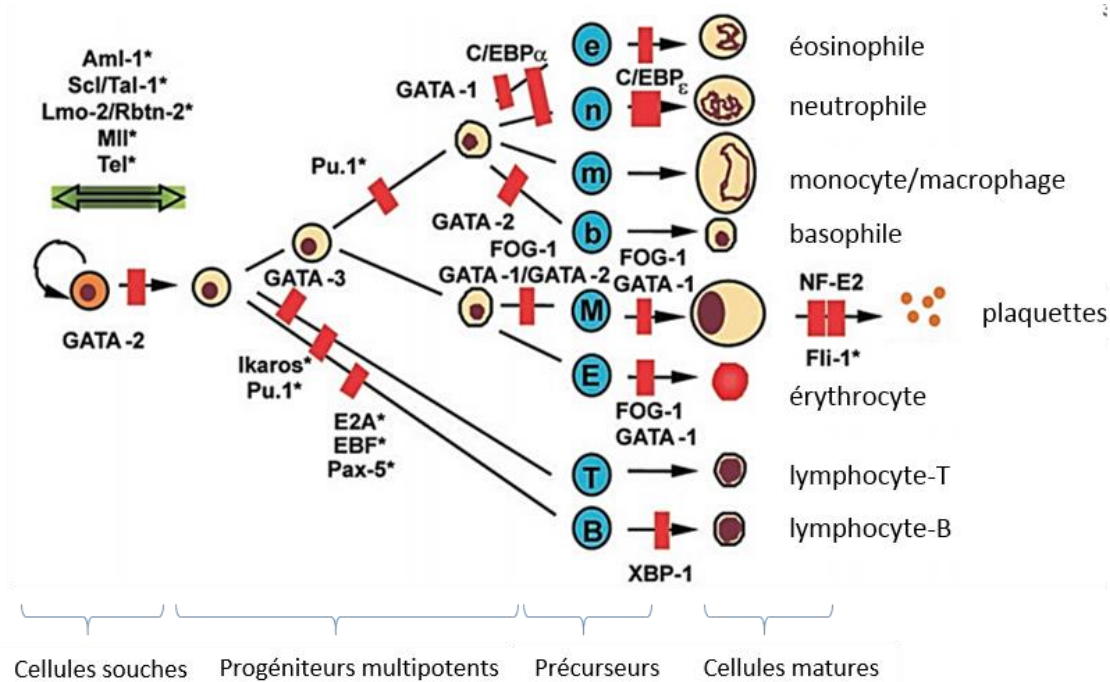


Figure 15 : Représentation schématique des facteurs de transcription requis pour l'hématopoïèse. Représentation des lignages de l'hématopoïèse depuis la cellule souche pluripotente aux cellules sanguines matures. Les barres rouges représentent le niveau de l'arrêt de maturation des cellules observées en absence des facteurs de transcription indiqués. Adapté de Cantor et Orkin, 2002.

En plus de ces facteurs largement décrits dans la littérature, de nombreuses autres protéines ont été impliquées dans ces processus de différenciation, et quelques études suggèrent l'implication de la kinase CHK1 dans le bon déroulement de l'hématopoïèse.

II. L'importance de CHK1 dans l'hématopoïèse normale

Plusieurs études ont étudié l'importance de CHK1 dans les cellules hématopoïétiques, et l'une d'entre elles a mis en évidence que l'inactivation de CHK1 par l'utilisation d'ARN interférence dans des progéniteurs hématopoïétiques engendre une apoptose massive des cellules sans impacter les profils de cycle cellulaire, mettant en avant l'importance de cette kinase dans le maintien de l'hématopoïèse normale (Hu et al., 2011). De plus, une étude très récente a mis en évidence l'importance de CHK1 dans l'établissement de l'hématopoïèse fœtale et de l'adulte (Schuler et al., 2019). Dans cette étude, les auteurs ont isolé des cellules souches hématopoïétiques (HSC) et des progéniteurs multipotents (MPP) à partir du foie ou de la moelle osseuse de souris, et ils ont pu observer que l'inactivation de CHK1 dans ces cellules induisait une mort par apoptose. De plus, en récupérant des cellules souches CD34⁺ du sang de cordon ombilical humain, les auteurs ont mis en avant que ces cellules perdaient leur potentiel à former des colonies en milieu semi-solide en réponse à l'inactivation de CHK1, et que ces cellules mourraient également suite à un traitement à des doses croissantes d'inhibiteurs (Schuler et al., 2019).

Cette étude montre donc l'importance de CHK1 pour la survie des cellules souches hématopoïétiques, et donc pour l'établissement de l'hématopoïèse.

D'autres études montrent l'importance de CHK1 dans l'hématopoïèse normale, en mettant en évidence un rôle de CHK1 dans la différenciation aussi bien dans les compartiments myéloïdes que lymphoïdes.

Une étude menée par Carrassa et ses collaborateurs a montré que l'inhibition pharmacologique de CHK1 avec la molécule AZD-7762 dans des cellules souches hématopoïétiques issues de donneurs sains (CD133+), conduit à une différenciation préférentielle des cellules en progéniteurs lymphoïdes (CD38+), au détriment des progéniteurs myéloïdes (CD33+). Cette étude permet de mettre en évidence que CHK1 a un rôle dans la différenciation précoce des cellules souches hématopoïétiques en progéniteurs myéloïdes (Carrassa et al., 2010). De plus, l'utilisation d'un autre inhibiteur pharmacologique dirigé contre CHK1 (UCN-01) dans la lignée leucémique U937, stimulée pour se différencier avec du PMA, entraîne une inhibition du processus de différenciation des monocytes myéloïdes, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose cellulaire (Rahmani et al., 2002).

Bien que ces études suggèrent l'importance de CHK1 dans la différenciation des cellules dans la voie myéloïde, CHK1 a également été identifiée dans plusieurs études comme impliquée dans la différenciation lymphoïde. Dans une première étude, des mutants conditionnels de souris invalidées pour CHK1 spécifiquement dans le lignage T ont été générées afin d'évaluer le rôle de cette protéine dans la prolifération et la différenciation normale de ces cellules (Zaugg et al., 2007). Cette étude a révélé que CHK1 est cruciale pour la survie et le développement des lymphocytes T. En effet, en absence de cette kinase, les thymocytes partent très rapidement en apoptose, empêchant la génération des cellules T matures. Plus récemment, une étude a décrit l'importance de CHK1 dans le lignage B. L'inhibition pharmacologique ou l'invalidation génétique de CHK1 dans des cellules B normales ou malignes, révèle en effet un rôle essentiel de CHK1 dans le développement normal des cellules B, ainsi que pour la lymphomagenèse et la survie de ces cellules tumorales (Schuler et al., 2017).

L'ensemble de ces études prouve donc l'importance de CHK1 dans la différenciation et la survie des cellules hématopoïétiques, aussi bien dans le lignage myéloïde que lymphoïde (Figure 16).

Pour compléter ces résultats, une étude portant sur les nouvelles fonctions de CHK1 a été réalisée en utilisant des souris hétérozygotes pour CHK1 +/- . Lors de cette étude, Boles et ses collaborateurs ont mis en évidence que les souris hétérozygotes pour CHK1 présentaient des défauts de différenciation érythrocytaire dus à l'apparition de dommages à l'ADN spontanés au niveau des précurseurs myéloïdes, et d'un défaut de mise en place de l'anneau contractile d'actine, essentiel lors de l'étape terminale de l'érythropoïèse permettant l'énucléation des érythrocytes (Boles et al., 2010). Dans cette même étude, les auteurs rapportent également que ces modèles murins hétérozygotes pour CHK1 présentent un déficit important du nombre de plaquettes circulantes, en comparaison aux souris sauvages. Ce résultat, non commenté par les auteurs, suggère que CHK1 pourrait jouer un rôle dans la différenciation

mégacaryocytaire. Pourtant, un autre article montre que le traitement des souris avec un inhibiteur de CHK1 (SCH-900776, 50mg/kg) n'a pas d'impact sur le nombre de globules rouges et de plaquettes circulants (Guzi et al., 2011). Afin de mieux comprendre ces résultats, il est important de noter que lors de cette dernière étude ne montrant aucun impact de l'inhibition de CHK1, les cellules ont été observées après seulement 14 jours de traitement, tandis que les résultats obtenus dans l'étude de Boles ont été obtenus sur des souris hétérozygotes âgées de 52 semaines. Cette importante différence de temps ainsi que la différence d'action entre un inhibiteur et la perte d'une copie du gène, peuvent largement expliquer ces différences de résultats.

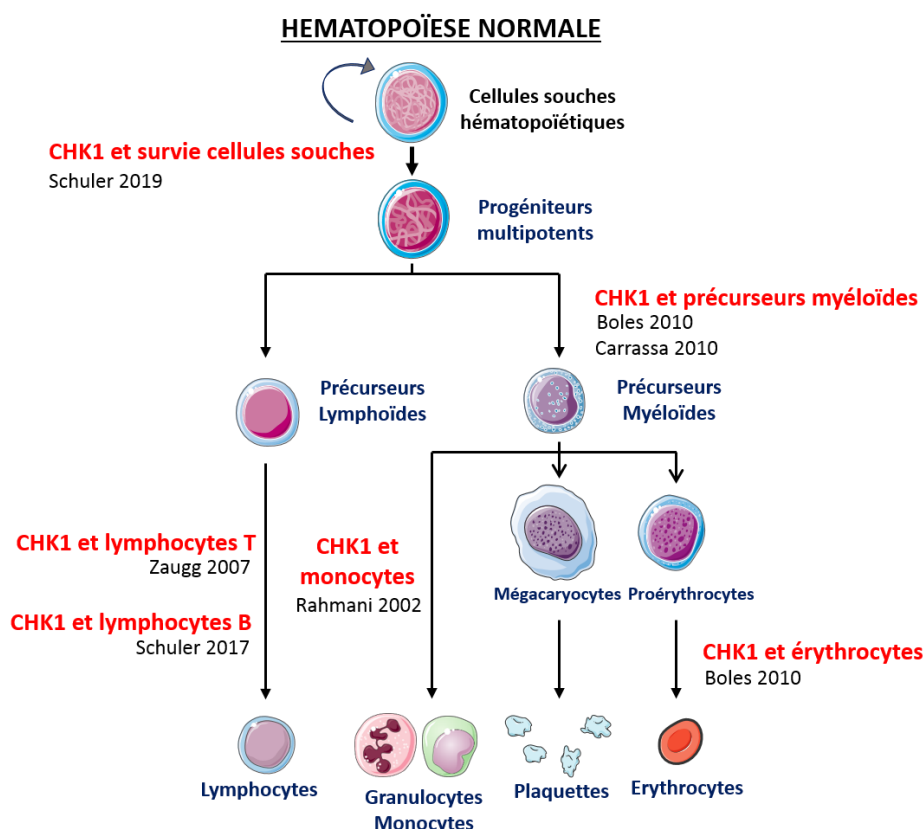


Figure 16 : Représentation schématique de l'importance de CHK1 aux différentes étapes de l'hématopoïèse. Représentation des lignages de l'hématopoïèse depuis la cellule souche pluripotente aux cellules sanguines matures. L'importance de CHK1 aux étapes de l'hématopoïèse est représentée en rouge.

Les résultats obtenus par Boles, mais non commentés, sur la diminution du nombre de plaquettes dans les souris hétérozygotes pour CHK1 nous ont amenés à nous demander quel était le rôle de CHK1 dans cette voie de différenciation mégacaryocytaire. Au cours de ma thèse, j'ai donc travaillé sur ce projet de recherche. Pour une meilleure compréhension de mes résultats, la différenciation mégacaryocytaire sera donc introduite dans la suite de mon manuscrit, et un intérêt particulier sera porté sur le facteur de transcription NF-E2, impliqué dans cette différenciation.

III. La différenciation mégacaryocytaire

1. Généralités

Les plaquettes sont de petites cellules circulantes du sang, anucléées, de 1 à 3 μm de diamètre, ayant des rôles majeurs dans la coagulation, l'inflammation mais également dans l'angiogenèse, l'immunité innée et la progression tumorale, grâce aux protéines cargos transportées dans leurs granules. Les plaquettes étant souvent la première ligne de défense, une différenciation rapide des cellules souches en mégacaryocyte est nécessaire pour réapprovisionner le stock de plaquettes.

Principalement dans la moelle osseuse des os longs chez l'adulte, mais également dans le foie et la rate chez l'embryon, **les mégacaryocytes (MK)** se développent à partir d'un progéniteur myéloïde (CMP), d'un progéniteur multipotent (MPP) ou d'une cellule souche hématopoïétique (HSC) (Machlus and Italiano, 2013 - Rodriguez-Fraticelli et al., 2018). Ces mégacaryocytes sont les cellules nucléées les plus grosses, puisqu'elles peuvent atteindre entre 50 et 100 μm de diamètre, mais sont également les cellules hématopoïétiques les plus rares puisqu'elles ne représentent que 0,01% de la moelle osseuse. Après des étapes de maturation, le contenu cytoplasmique de ces mégacaryocytes va permettre la formation des **plaquettes** (Machlus et al., 2013 – Noetzli et al., 2019 – Vainchenker et al., 2019).

2. Les étapes de la mégacaryocytopoïèse

Pour permettre la production des plaquettes, les mégacaryocytes passent par plusieurs étapes de maturation permettant le développement de cette cellule géante, avec l'accumulation du **matériel nucléaire et cytoplasmique** de cette cellule. De façon schématique, cette maturation peut être divisée en deux étapes :

- La première phase est la **maturation nucléaire du mégacaryocyte**, qui dure quelques jours, et consiste en des étapes d'endomitose permettant d'avoir un noyau polyploïde contenant entre 16N et 128N.
- La seconde phase consiste en un **remodelage du cytoplasme** du mégacaryocyte, étape beaucoup plus rapide puisqu'elle ne dure que quelques heures, et qui conduit à la formation de longues et fines extensions arborescentes appelées proplaquettes permettant la production des plaquettes matures (Figure 17) (Machlus et al., 2013 – Noetzli et al., 2019 - Vainchenker et al., 2019).

La maturation d'un mégacaryocyte chez l'homme prend environ 5 jours, tandis que ce processus ne prend que 2 à 3 jours chez la souris. Chaque mégacaryocyte mature aura la capacité de produire environ 10 000 plaquettes, qui auront une durée de vie de 7 à 10 jours chez l'homme, contre seulement 4 à 5 jours chez la souris (Machlus et al., 2013).

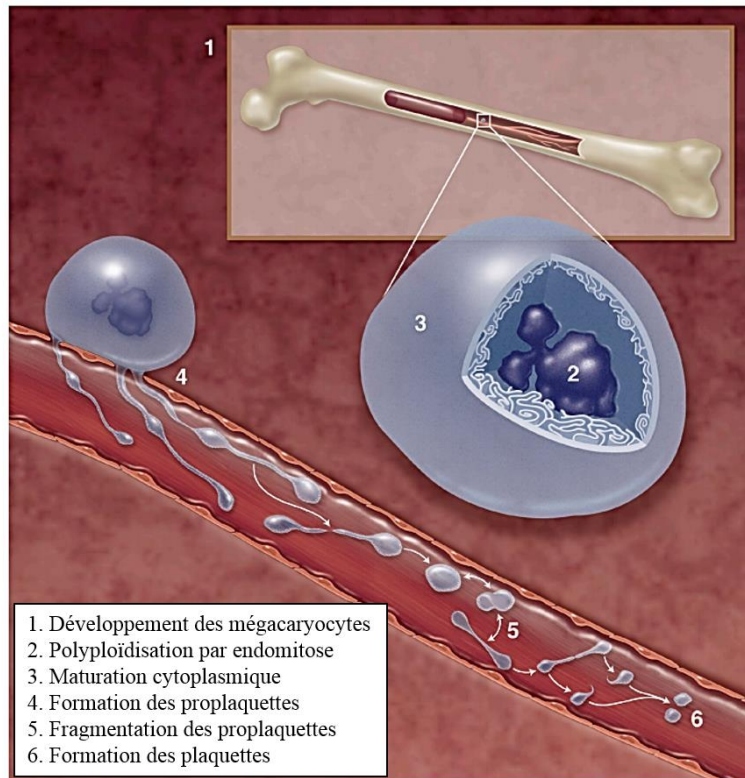


Figure 17 : Représentation schématique de la différenciation mégacaryocytaire et de la production des plaquettes. (1) Les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse se différencient en mégacaryocytes suite à une stimulation à la TPO. (2) Les mégacaryocytes subissent des endomitoses successives permettant leur maturation nucléaire. (3) Un système de membranes invaginées se développe, pour servir de réservoir à la formation des plaquettes. (4) Les mégacaryocytes matures migrent vers un vaisseau pour former les proplaquettes en produisant des extensions cytoplasmiques. (5) Les proplaquettes vont se convertir de manière réversible en pré-plaquettes, (6) puis en plaquettes. Adapté de Machlus et al., 2013.

2.1. Maturation nucléaire

Comme évoqué précédemment, le mégacaryocyte est une cellule polyploïde, signifiant qu'elle possède plus de deux lots de chromosomes homologues. Cette polypléidisation va avoir lieu suite à des cycles de réplication de l'ADN sans division cellulaire, appelés **endomitoses**.

Au début de leur différenciation, les progéniteurs mégacaryocytaires subissent un changement de programme induisant la perte de leur capacité de prolifération. Ces cellules vont alors entamer des cycles cellulaires incomplets, où les premières étapes du cycle, c'est à dire les phases G1, la réplication et la phase G2 se dérouleront normalement, mais où la mitose sera avortée au niveau de l'anaphase tardive. En effet, un défaut lors des étapes ultimes de la cytokinèse est retrouvé, dû à une diminution de l'expression de la chaîne lourde de la myosine IIB ainsi que de la protéine RhoA. Ceci conduit à un défaut de formation de l'anneau contractile de myosine, qui n'a plus la force nécessaire pour séparer la cellule mère en deux cellules filles (Geddis et al., 2007 – Lordier et al., 2008 – Melendez et al., 2011 - Machlus and Italiano, 2013 - Vainchenker et al., 2019). Ce cycle ne conduira donc pas à la production de deux cellules filles, mais à une accumulation du matériel nucléaire dans la cellule mère. Ces cellules passeront alors d'un état diploïde (2N) à tétraploïde (4N), et poursuivront ces cycles d'endomitoses pour atteindre jusqu'à 128N (Zimmet et al., 2000).

En plus de ce défaut au niveau de l'anneau contractile de myosine lors de la cytokinèse, il a été décrit que la polypléidisation était dépendante de la dégradation de la cycline B, conduisant à une diminution

de l'activité du complexe CDK1/cycline B et une diminution de CDC25C (Datta et al., 1996 - Garcia et al., 1996 - Zhang et al., 1996 et 1998).

Cette maturation nucléaire du mégacaryocyte permettra à cette cellule géante de produire les quantités d'ARNm et de protéines nécessaires à sa maturation cytoplasmique, qui seront ensuite incorporées dans les plaquettes, même si pour l'heure aucune corrélation n'est établie entre la quantité du matériel nucléaire du mégacaryocyte et son efficacité pour la formation des proplaquettes (Zimmet et al., 2000 - Vainchenker et al., 2019).

2.2. Maturation cytoplasmique

Après cette première étape de maturation, le mégacaryocyte est prêt pour l'étape de **maturation cytoplasmique**.

Comme évoqué ultérieurement, le rôle des plaquettes repose en partie sur la présence de protéines cargos dans leurs granules. Une des étapes de la maturation cytoplasmique du mégacaryocyte consiste donc à produire ces granules, soit de type α qui contiennent des protéines nécessaires à l'adhérence plaquettaire, soit des granules denses contenant des molécules telles que l'ADP, la sérotonine ou l'épinéphrine. Ces granules dérivent du bourgeonnement de petites vésicules au niveau de l'appareil de Golgi des mégacaryocytes (Machlus and Italiano, 2013).

La seconde étape caractéristique de la maturation cytoplasmique est la formation progressive d'un « système de démarcation des membranes » (DMS) aussi appelé « système de membranes invaginées » (IMS), formé en continuité avec la membrane plasmique. Les noms donnés à ce système viennent de sa caractéristique morphologique à diviser ou démarquer le cytoplasme du mégacaryocyte en petites régions à partir desquelles des invaginations seront formées pour donner les proplaquettes (Machlus and Italiano, 2013).

Une fois la synthèse des granules correctement effectuée et le système de membranes invaginées en place, le mégacaryocyte est mature.

2.3. Formation des proplaquettes et plaquettes

Le mégacaryocyte mature va ensuite migrer au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins sinusoïdes de la moelle osseuse pour produire les plaquettes à partir de son système de membrane de démarcation (DMS). Le mégacaryocyte va externaliser le DMS pour former de fines et longues extensions cytoplasmiques appelées pseudopodes, qui vont s'allonger et s'infiltrer à travers la membrane basale de l'épithélium vasculaire pour atteindre la lumière du vaisseau. Un réseau de proplaquettes fines et branchées va alors se former dans le vaisseau. La tubuline dirige cette élongation et l'actine participe au branchement de ces proplaquettes. Les organelles et les granules présentes dans le cytoplasme du mégacaryocyte vont alors être transportés *via* les microtubules le long de ces pseudopodes. La totalité du cytoplasme du mégacaryocyte, et donc le DMS qu'il contient, va être converti en proplaquettes,

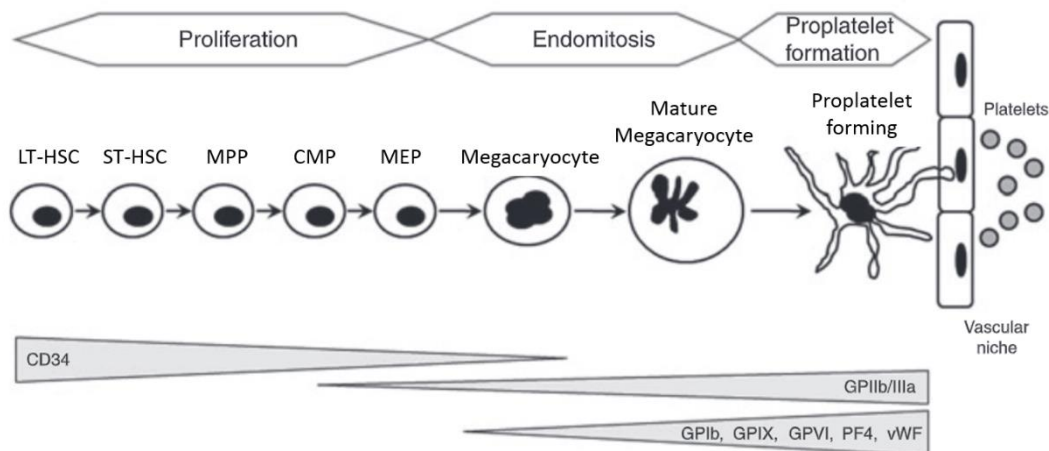
tandis que le noyau multilobé reste dans le corps cellulaire pour être dégradé par apoptose et phagocytose (Gordge et al., 2005 – Blair et al., 2009).

Une fois dans les vaisseaux, les proplaquettes vont poursuivre leurs changements morphologiques, pour se convertir de manière réversible en pré-plaquettes, et finalement donner les plaquettes après fragmentation de la proplaquette par abscission (Machlus and Italiano, 2013).

2.4. Les marqueurs de surface au cours de la mégacaryocytopoïèse

Les étapes de cette différenciation peuvent être suivies par différents marqueurs, tels que les clusters de différenciation GPIIIa (ou CD61), GPIIb (ou CD41a) et GPIb (ou CD42) (Figure 18). La mégacaryocytopoïèse est caractérisée par l'augmentation de l'expression des clusters GPIIIa et GPIIb, qui forment un récepteur hétérodimérique présent à la surface de la membrane plasmique des cellules impliquées dans cette différenciation, c'est à dire du progéniteur mégacaryocytaire jusqu'à la plaquette. L'expression de ce récepteur permet de suivre la mégacaryocytopoïèse puisque son expression augmente au cours de cette différenciation. L'expression du cluster GPIb est un peu plus tardive que les GPIIIa et GPIIb, et sert à reconnaître les mégacaryocytes plus matures. Le marqueur GPVI est également un marqueur de surface de la différenciation mégacaryocytaire un peu plus tardif (Séverin et al., 2010).

Figure 18 : Représentation schématique des clusters de différenciation exprimés au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Les marqueurs de surface associés permettent de suivre le développement du



mégacaryocyte au cours de sa différenciation. Adapté de Séverin et al., 2010.

3. Induction de la différenciation par la TPO

La différenciation mégacaryocytaire est stimulée par plusieurs cytokines (IL-3, IL-6, IL-11...), ou le facteur Stem Cell Factor (SCF), mais le facteur majeur est la **thrombopoïétine (TPO)**, qui joue un rôle prédominant lors des premières étapes de la différenciation.

La TPO est apparue pour la première fois dans la littérature en 1958, décrite comme le premier régulateur de la production des plaquettes (Kelemen et al., 1958), puis a ensuite été clonée, de même que son récepteur c-Mpl, en 1994. Des travaux ont pu montrer son implication dans le développement et la maturation de précurseurs en mégacaryocytes (Kaushansky et al., 1994 - Wendling et al., 1994).

La TPO est principalement produite par le foie, mais certains organes tels que les reins ou encore les muscles lisses expriment le gène (Hitchcock et al., 2014). Une fois synthétisée, la TPO circule dans le plasma, où elle se retrouve séquestrée par les plaquettes. De ce fait, la réduction du nombre de plaquettes induit une augmentation du niveau de TPO libre circulante, lui permettant d'exercer ses effets stimulateurs en se fixant à son récepteur sur les cellules souches de la moelle osseuse, augmentant ainsi le nombre de mégacaryocytes et la production des plaquettes (Noetzli et al., 2019).

Le récepteur de la TPO, le c-Mpl, est un récepteur transmembranaire indispensable pour la croissance et la différenciation de ces cellules. Le c-Mpl est dépourvu d'activité kinase intrinsèque et est retrouvé sous forme homodimérique inactif, associé à la tyrosine kinase cytoplasmique JAK2 (Janus kinase 2). Après fixation de la TPO, le récepteur c-Mpl subit un changement conformationnel et se dimérise, rapprochant ses domaines cytoplasmiques et permettant ainsi le rapprochement des protéines JAK2 associées au récepteur. Les protéines JAK2 vont alors s'activer par trans-phosphorylation et phosphoryler le récepteur c-Mpl sur les tyrosines 625 et 630, permettant ainsi l'ancrage pour des protéines contenant des domaines SH2 (Src Homology domain 2), qui moduleront la signalisation en aval du récepteur (Figure 19) (Geddis, 2010 – Kaushansky, 2016). Suite à l'activation des protéines JAK2, 3 grandes voies de signalisation cellulaire vont être activées, permettant la mise en place de la réponse cellulaire. Ces grandes voies sont la voie STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), la voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), et la voie PI3K (Phosphoinositol-3-kinase) (Figure 19).

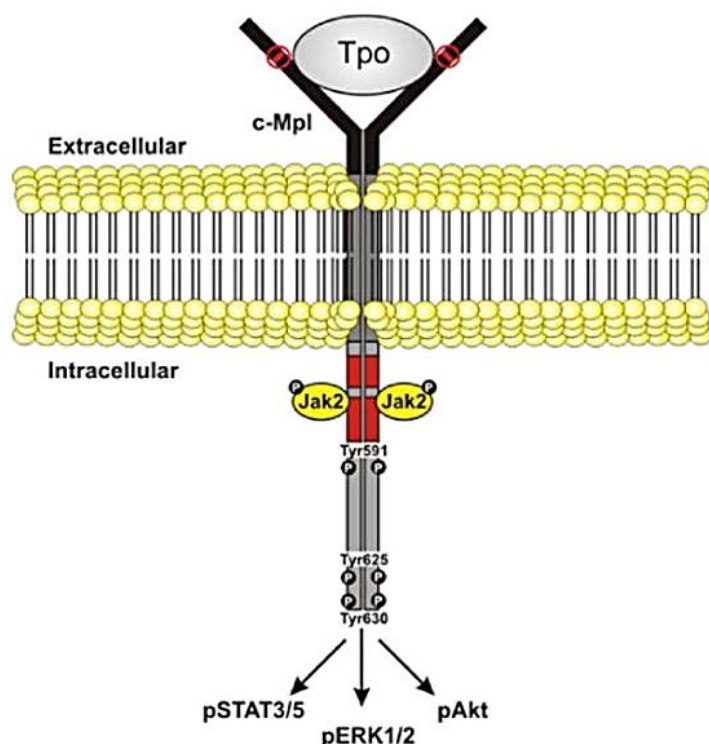


Figure 19 : La signalisation induite par la thrombopoïétine (TPO). c-Mpl est le récepteur de la TPO, présent sous forme homodimérique qui s'associe à la tyrosine kinase cytoplasmique JAK2. Après fixation de la TPO, le récepteur subit un changement conformationnel, induisant l'activation de JAK2 et la signalisation des voies en aval STAT, MAPK et PI3K. D'après Geddis, 2010.

Des travaux menés sur des modèles murins déficients pour l'expression du récepteur c-Mpl ou pour la production de la TPO, ont montrés une diminution du nombre de mégacaryocytes et de plaquettes circulantes dans ces souris en

comparaison au souris sauvages, mais également que ces plaquettes étaient parfaitement normales (Gurney et al., 1994 - Geddis et al., 2010). De plus, chez des patients ayant une perte de fonction du récepteur c-Mpl, le nombre de plaquette dans le sang est fortement réduit, mais une production minimale de plaquette est tout de même conservée (van den Oudenrijn et al., 2000). Ces différentes études prouvent que la TPO et son récepteur sont donc des régulateurs cruciaux de la production des plaquettes, au niveau quantitatif mais non qualitatif, suggérant que la TPO n'a pas de rôle essentiel dans les étapes terminales de la formation des plaquettes.

4. Régulation de la différenciation mégacaryocytaire par des facteurs de transcription

Comme dit précédemment, l'hématopoïèse est finement régulée grâce à de nombreux facteurs de transcription exprimés de manière différentielle. La différenciation mégacaryocytaire n'échappe pas à cette régulation et de nombreux facteurs de transcription tels que RUNX1, GATA1, c-Myb, Fli1 et NF-E2, forment des complexes régulant cette différenciation à la fois positivement et négativement.

Le facteur de transcription **RUNX1** (Runt-related transcription factor 1) a notamment un rôle important dans le développement des mégacaryocytes, car des souris chez lesquelles RUNX1 est conditionnellement invalidé présentent une thrombocytopénie et une mégacaryocytopoïèse altérée (Ichikawa et al., 2004 - Geddis, 2010). En effet, RUNX1 permet d'orienter la différenciation du progéniteur commun vers la différenciation mégacaryocytaire en réprimant l'expression des gènes impliqués dans la différenciation érythrocytaire (Kuvardina et al., 2015). Ce facteur de transcription n'agit pas seul puisqu'il interagit avec le facteur de transcription GATA1 (Elagib et al., 2003).

Le facteur **GATA1** (Globulin Transcription Factor 1) régule également la différenciation mégacaryocytaire, notamment en s'associant avec son co-facteur Fog1 (Friend of Gata1). **Fli1** (Friend leukemia integration 1 transcription factor) et GATA1 agissent également conjointement pour réguler cette différenciation, car des sites de fixation pour ces deux facteurs de transcription ont été mis en évidence au niveau des promoteurs de nombreux gènes spécifiques à la mégacaryocytopoïèse, et il a été décrit que Fli1 renforce l'activité de GATA1 au niveau de ces promoteurs (Eisbacher et al., 2003). De plus, l'invalidation de Fli1 a également été décrite comme induisant une diminution du niveau de GATA1 au niveau de ses promoteurs cibles, ainsi qu'une perte des mégacaryocytes matures et une diminution du nombre de plaquette dans des modèles de souris (Moussa et al., 2010).

A l'inverse, les facteurs de transcription **c-Myb** et **ETV6** sont des régulateurs négatifs de la mégacaryocytopoïèse puisqu'ils favorisent la différenciation des progéniteurs mégacaryocyte-érythrocytes (MEP) en érythrocytes (Metcalf et al., 2005 – Takahashi et al., 2005).

Pour finir, le **facteur de transcription NF-E2** (Nuclear Factor Erythroid derived 2) est nécessaire lors des étapes terminales de la maturation des mégacaryocytes ainsi que pour la production des pro-plaquettes.

Dans mon travail de thèse, je me suis justement intéressée à ce facteur de transcription, et plus particulièrement en étudiant le lien pouvant exister entre CHK1 et NF-E2 au cours de la différenciation mégacaryocytaire.

5. [Le facteur de transcription NF-E2](#)

5.1. Description

NF-E2 est une protéine hétérodimérique constituée d'une sous-unité p45 (codée par le gène *NFE2*) et d'une petite sous-unité p18, qui contiennent toutes les deux un motif b-Zip (basic leucine zipper) permettant la liaison à la séquence consensus (T/C)GCTGA(C/G)TCA(T/C) des promoteurs (Figure 20) (Igarashi et al., 1994 - Andrews, 1998 - Gasiorek et al., 2015). La grande sous-unité p45 NF-E2 appartient à la famille des facteurs de transcription CNC (pour Cap and Collar), et la petite sous-unité p18 appartient aux protéines de la famille Maf. La région C-terminale de p18 a été décrite comme nécessaire à l'activation de NF-E2 (Motohashi et al., 2002 - Motohashi et al., 2011).

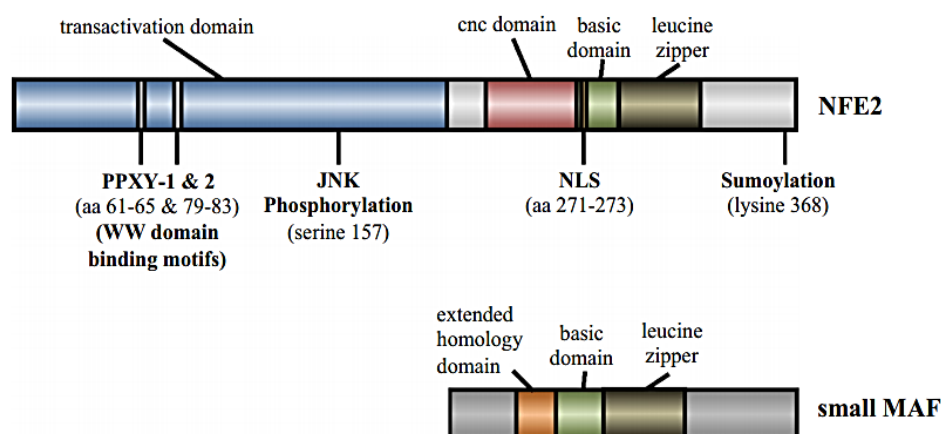


Figure 20 : Structure de NF-E2 avec ses sous-unités p45 et p18. NF-E2 est une protéine hétérodimérique constituée d'une sous-unité p45 et d'une petite sous-unité p18, qui contiennent toutes les deux un motif b-Zip (basic leucine zipper) permettant la liaison aux promoteurs. D'après Gasiorek et al., 2015.

5.2. Rôles

NF-E2 est majoritairement exprimé dans les cellules hématopoïétiques, et notamment dans les érythrocytes, les mégacaryocytes et les mastocytes (Gasiorek et al., 2015).

Le rôle principal de NF-E2 dans les mégacaryocytes est la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la maturation de ces cellules et la biogénèse des plaquettes. NF-E2 possède de nombreuses cibles puisqu'une étude de ChIP-seq a identifié 49 gènes directement activés par NF-E2, dont 15 impliqués dans la thrombogenèse, ainsi que 10 gènes réprimés par NF-E2 (Fujita et al., 2013). Néanmoins, les cibles principales de NF-E2 sont la thromboxane A synthase 1 (TBX) (Deveaux et al., 1997), la P-selectine (SELP) et la myosine 9 (chaîne légère de la myosine, Myl9) (Fujita et al., 2013).

NF-E2 joue un rôle important dans la mégacaryocytopoïèse, puisque l'invalidation de la petite ou de la grande sous unité de NF-E2 provoque une thrombocytopénie sévère et une hémorragie létale chez la souris. De manière intéressante, dans chacun de ces mutants, les mégacaryocytes matures sont retrouvés accumulés dans la moelle osseuse et la rate, et la formation des pro-plaquettes est totalement inhibée (Lecine et al., 1998 - Levin et al., 1999 - Shivdasani et al., 1995 – Onodera et al., 2000). Ces résultats montrent un **rôle de NF-E2 au cours des étapes terminales de la mégacaryocytopoïèse et de la production des pro-plaquettes.**

5.3. Régulation de NF-E2

Pour exercer son activité transcriptionnelle, NF-E2 a besoin d'être transporté dans le noyau grâce à sa région de localisation nucléaire NLS (Perdomo et al., 2010). Une fois dans le noyau, NF-E2 est localisé à l'euchromatine, tandis que son partenaire p18 est présent à l'hétérochromatine. Lors de la différenciation, la sous-unité p18 est alors relocalisée à l'euchromatine permettant la formation de l'hétérodimère avec NF-E2 et son activation (Gasiorek et al., 2015).

NF-E2 est également sujet à des modifications post-traductionnelles modulant son activité transcriptionnelle (Figure 20). Ce facteur de transcription a notamment été retrouvé sumoylé sur la lysine 368 augmentant ainsi son affinité de liaison à l'ADN (Shyu et al., 2005), ubiquitylé par l'E3 ligase ITCH diminuant son activité en le séquestrant dans le cytoplasme (Lee et al., 2008) et phosphorylé sur la sérine 157 par la protéine JNK induisant l'ubiquitylation de NF-E2 et sa dégradation (Lee et al., 2010b). Ces modifications post-traductionnelles jouent donc des rôles cruciaux dans la régulation de l'activité de NF-E2, mais les détails des mécanismes moléculaires ainsi que leurs importances *in vivo* restent à approfondir.

Néanmoins, la compréhension de ces modifications représente un axe d'étude intéressant pour pouvoir moduler l'activité ou les niveaux de NF-E2 dans des maladies hématopoïétiques. En effet, NF-E2 est retrouvé surexprimé chez les patients atteints de polycythemia vera (PV), une pathologie hématologique caractérisée par une sur-production des érythrocytes et parfois des mégacaryocytes et des plaquettes, et la sévérité de ce symptôme est corrélée au niveau de NF-E2 (Goerttler et al., 2005). De plus, des souris transgéniques sur-exprimant NF-E2 dans les cellules hématopoïétiques présentent les caractéristiques de néoplasies myéloprolifératives, telles que des thromboses, ainsi que l'apparition spontanée de Leucémies Aiguës Myéloïdes (Kaufmann et al., 2012). **Ces études mettent en avant un rôle de NF-E2 dans les pathologies myéloprolifératives, prouvant la nécessité de mieux comprendre les mécanismes de régulation de ce facteur de transcription.**

Avec l'ensemble de ces données de la littérature, la différenciation mégacaryocytaire apparaît donc comme un processus en plusieurs étapes, qui se doit d'être régulée.

Malgré plusieurs études montrant l'importance de CHK1 dans l'hématopoïèse normale, aucun travail n'a pour l'heure évalué clairement le rôle de CHK1 dans ce processus. Le second axe de

ma thèse portera donc sur ce projet, en étudiant le lien pouvant exister entre CHK1 et NF-E2 au cours de la différenciation mégacaryocytaire

Nous avons jusqu'ici présenté le rôle de CHK1 dans l'hématopoïèse normale, mais la kinase a également été impliquée dans la pathogénicité des Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM).

Dans la suite de l'étude bibliographique, nous nous intéresserons donc à l'hématopoïèse leucémique, en présentant l'épidémiologie des LAM, leurs traitements et l'importance de CHK1 dans ce contexte.

IV. Les Leucémies Aiguës Myéloïdes

1. [Hématopoïèse leucémique](#)

Les **Leucémies Aiguës Myéloïdes** (LAM) représentent un groupe hétérogène d'hémopathies dues à une expansion clonale de cellules myéloïdes malignes. Les LAM sont causées par un défaut de l'hématopoïèse suite à l'apparition de mutations ou d'aberrations chromosomiques dans les cellules souches hématopoïétiques ou les cellules progénitrices myéloïdes. Les cellules souches leucémiques vont alors donner des progéniteurs leucémiques, engagés dans la voie myéloïde avec un potentiel de prolifération extrêmement élevé, mais bloqués dans la différenciation. Ces cellules immatures et non fonctionnelles appelées blastes, vont s'accumuler dans la moelle osseuse et dans le sang au détriment des cellules hématopoïétiques matures normales. C'est cet envahissement de la moelle qui est à l'origine des signes cliniques de la maladie (Löwenberg et al., 1999).

La majorité des LAM sont dites *de novo*, c'est-à-dire qu'elles apparaissent sans facteur de risque identifié. Mais, quelques LAM peuvent également apparaître suite à l'évolution d'un syndrome myélodysplasique ou myéloprolifératif, ou être causées par un traitement tel que la chimiothérapie ou la radiothérapie, on parlera alors de LAM secondaire.

2. [Epidémiologie des LAM](#)

Les LAM sont les leucémies aiguës de l'adulte les plus fréquentes (80%). Le caractère aigu des LAM est défini par l'évolution rapide des symptômes et des signes biologiques de la maladie. En France, on dénombre 3000 nouveaux cas de LAM par an, et l'incidence des LAM est de l'ordre de 4 à 5 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an. Cette maladie affecte les individus des deux sexes avec une légère prédominance masculine (sex ratio 1.5), pouvant apparaître à tout âge, mais touchant plus fréquemment les personnes âgées de plus de 65 ans avec un âge médian à 70 ans (Hematocell.fr [en ligne] - DiNardo et al., 2016).

2.1. Présentation clinique des LAM

Les signes cliniques et symptômes associés aux LAM sont divers, peu spécifiques, et sont la conséquence de la prolifération des blastes et de leur envahissement dans la moelle. Ceci conduit à des cytopénies sanguines pouvant entraîner des baisses du nombre de leucocytes (leucopénie), de plaquettes (thrombopénie) et des érythrocytes (anémie), et/ou à l'accumulation de blastes dans les vaisseaux sanguins (leucostase) ou au niveau de certains organes. Typiquement, les symptômes observés chez ces patients sont : fatigue, pâleur, dyspnée d'effort, hémorragies, fièvre et infections en rapport avec une diminution respective des érythrocytes, des plaquettes et des leucocytes et polynucléaires neutrophiles (Löwenberg et al., 1999). L'invasion leucémique de plusieurs tissus, incluant les organes hématopoïétiques secondaires (foie, rate, ganglions lymphatiques), la peau, les gencives, les testicules et le système nerveux central, peut aussi conduire, respectivement, à l'apparition d'une hépatomégalie, d'une splénomégalie, d'adénopathies, de leucémides cutanées, d'une hypertrophie gingivale, d'une hypertrophie testiculaire, de dysesthésies de la houppe du menton et/ou d'autres paralysies périphériques (Löwenberg et al., 1999). Le diagnostic repose sur l'examen de la moelle osseuse, appelé myélogramme, après l'identification d'au moins 20% de blastes leucémiques parmi les cellules nucléées au niveau de la moelle osseuse.

2.2. Cytologie des LAM

Différents sous-types de LAM ont été identifiés de par l'hétérogénéité des stades de différenciation auxquels les cellules leucémiques se trouvent bloquées. La première méthode de classification utilisée a été développée par le groupe Franco-Américano-Britannique (FAB), et repose sur des critères morphologiques des blastes et des marquages cytochimiques. Cette classification a identifié 8 sous-types distincts de LAM qui diffèrent selon le stade de différenciation des cellules leucémiques (Tableau 4) (Löwenberg et al., 1999). La classification des LAM a été remise à jour en 2008 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), pour prendre notamment en compte les caractéristiques génétiques, utiles pour déterminer le pronostic et le traitement optimal. En 2016, l'OMS a révisé la classification afin d'intégrer les informations récentes concernant la clinique, le pronostic, la morphologie, l'immunophénotype et la génétique apparues depuis 2008 (Tableau 5). La classification OMS complète systématiquement la classification FAB (Hematocell.fr [en ligne]).

Tableau 4 : Classification FAB des LAM. MPO = myéloperoxydase ; ATRA = acide tout-trans rétinolique. D'après Hematocell.fr [en ligne].

Classification FAB	Désignation et caractéristiques	Particularités clinico-biologiques	Fréquence (%des LAM)
--------------------	---------------------------------	------------------------------------	----------------------

LAM0	Différenciation minimale Pas de granulation ni corps d'Auer, cytochimie MPO négative		2%
LAM1	Peu ou pas de maturation (moins de 10% de cellules au-delà du promyélocyte). Quelques granulations, parfois un corps d'Auer, MPO positive		20%
LAM2	Avec maturation Granulations et un corps d'Auer fréquents, persistance d'une lignée granulocytaire, MPO positive	t(8 ;21)	30%
LAM3	Leucémie aigüe promyélocytaire Blastes (>20-30%) hypergranuleux, nombreux corps d'Auer, MPO positive	Sensibilité à l'ATRA t(15 ;17)	10%
LAM4	Leucémie myélomonocytaire aigüe Aspect de LAM2, avec monocytose sanguine >5g/L ou monocytose médullaire >20%	Hyperleucocytose fréquente. Inversion du chromosome 16 (LAM4 avec éosinophiles anormaux)	15%
LAM5	Leucémie aigüe monoblastique LAM5a : peu de maturation (plus de 80% de monoblastes) ; LAM5b : maturation (<80% monoblastes). MPO négative ou finement positive 5 à 10% de cellules éosinophiles présentant des granulations basophiles	Localisations cutanées et muqueuses, rechutes neuro- mningées et CIVD fréquentes. Anomalies en 11q23, t(8 ;16), t(11 ;-)	15%
LAM6	Erythroleucémie Erythroblastes >50% Myéloblastes >20%	Caryotypes complexes	5%
LAM7	Leucémie mégacaryoblastique Les blastes sont des cellules mégacaryocytaires plus ou moins différenciées, MPO négative	Fibrose médullaire. Trisomie 21.	2%

Tableau 5 : Classification OMS des LAM 2016.
D'après Arber et al, 2016

Classification OMS des LAM	Caractéristiques
----------------------------	------------------

LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes	<ul style="list-style-type: none"> - LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; réarrangement RUNX1 - RUNX1T1 - LAM avec inv(16) (p13.1;q22) ou t(16 ;16) (p13.1 ;q22) ; réarrangement CBFβ - MYH11 - LA promyélocytaire avec t(15 ;17)(q22 ;q12) ; réarrangement PML - RARα - LAM avec t(9;11) (p22;q23) ; réarrangement MLLT3 - MLL - LAM avec t(6;9) (p23;q34) ; DEK - NUP214 - LAM avec inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2) ; réarrangement GATA2, MECOM - LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22) (p13;q13) ; réarrangement RBM15 - MKL1 - LAM avec mutation NPM1 - LAM avec mutation bi-allélique CEBPA - LAM avec BCR-ABL1 - LAM avec mutation RUNX1
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies	
Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie	-LAM ou syndrome myélodysplasique
LAM sans autre spécification (NOS)	<ul style="list-style-type: none"> - LA Myéloblastique avec différenciation minimale - LA Myéloblastique sans maturation - LA Myéloblastique avec maturation - LA Myélomonocytaire - LA Monoblastique ou monocytaire - LA Erythroblastique - LA Mégacaryoblastique - LA Myéloblastique à composante basophile - LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)
Sarcome granulocyttaire	
Proliférations myéloïdes associées au syndrome de Down	<ul style="list-style-type: none"> - Réaction leucémoïde transitoire - LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle
Leucémies aiguës de lignée ambiguë	<ul style="list-style-type: none"> - Leucémie aiguë indifférenciée - Leucémie aiguë de lignée mixte (LALM) avec t(9;22)(q34.1;q11.2) ; BCR-ABL1 - LALM avec t(v;11q23.3); réarrangement de KMT2A - LALM B/myéloïde, NOS - LALM, T/myéloïde, NOS

2.3. Les mutations impliquées dans les LAM

Les premières études menées pour comprendre les mécanismes conduisant à l'apparition des LAM proposaient un modèle du « double hit », suggérant que l'apparition de la leucémie nécessitait seulement deux mutations dites « driver » ayant chacune un effet bien distinct sur les cellules leucémiques. Dans ce modèle, les mutations étaient classées en deux catégories (Renneville et al., 2008) :

- Les mutations de type I (FLT3, c-Kit, RAS, c-Myc...) responsables de l'excès de prolifération des progéniteurs leucémiques en activant la signalisation cellulaire
- Les mutations de type II (AML1, CEBPA...) responsables du blocage de différenciation de ces cellules en touchant les facteurs de transcription hématopoïétiques.

Cependant, ce modèle a été revu suite à des données montrant le rôle de mutations de type I dans l'arrêt de la différenciation (Sexauer et al, 2012 ; Radomska et al, 2012) et suite à l'identification récurrente de nombreuses mutations chez les patients (Ley et al, 2013).

L'ensemble des mutations impliquées dans la leucémogénèse ont donc été groupées en 8 catégories et sont représentées dans la figure 21 (Döhner et al., 2015 - DiNardo et al., 2016).

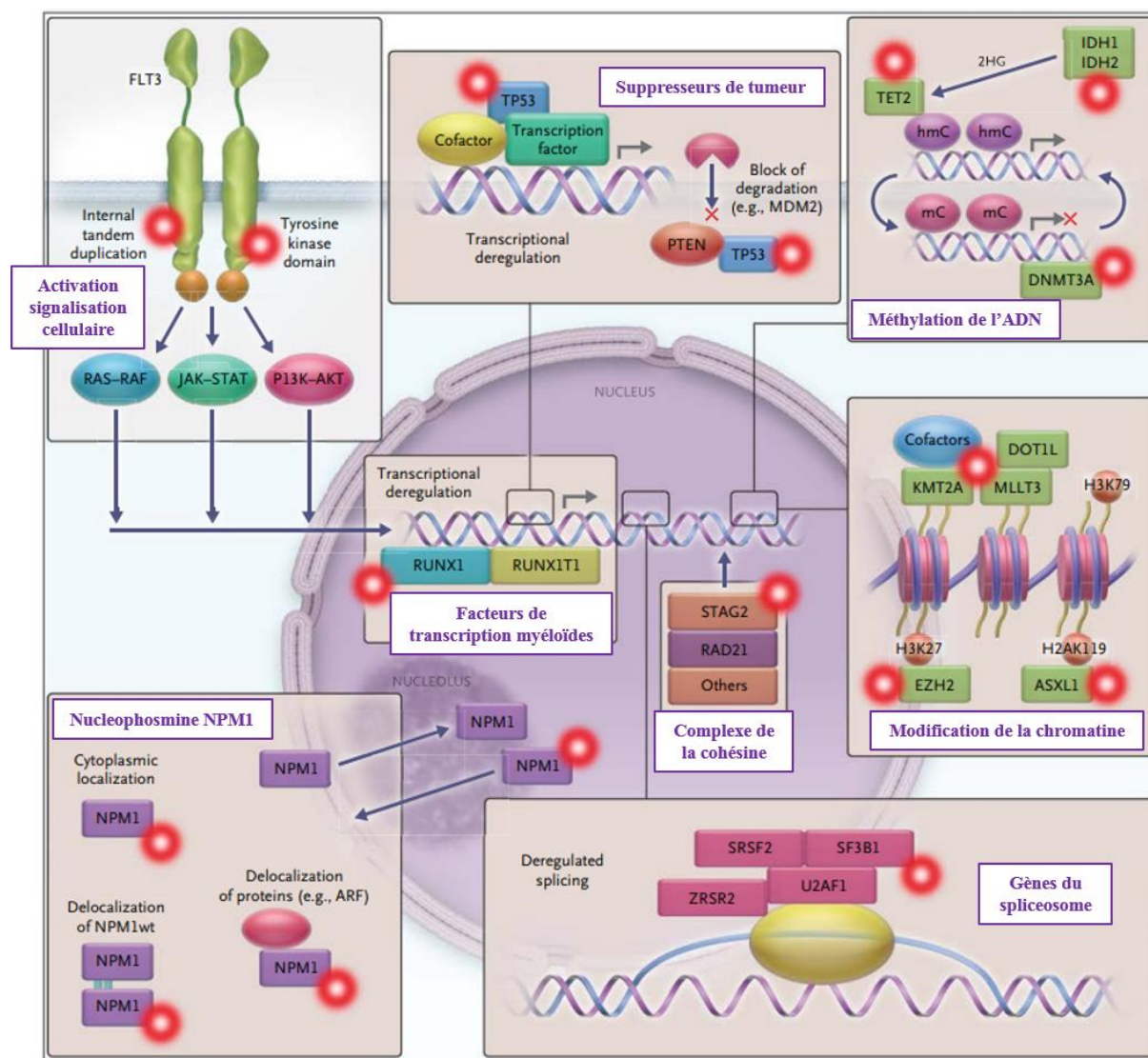


Figure 21 : Illustration des 8 catégories de gènes mutés de manière récurrente dans les LAM.

L'identification de mutations récurrentes chez les patients de LAM a permis de regrouper les gènes mutés en 8 catégories. Adapté de Döhner et al., 2015

2.4. Les traitements des LAM

Le traitement conventionnel repose sur une chimiothérapie intensive associant plusieurs agents génotoxiques. Cette chimiothérapie comporte une première phase d'induction ayant pour but d'obtenir la rémission complète de la maladie, suivie d'une phase de consolidation afin de prévenir les rechutes.

Lors de la phase d'induction, deux agents génotoxiques sont utilisés en association : une anthracycline (daunorubicine, l'idarubicine ou la mitoxantrone, inhibiteurs des topoisomérases II), utilisée pendant 3 jours, suivie d'un traitement avec un analogue nucléotidique, la cytarabine (Ara-C, analogue nucléoside), pendant 7 jours. La rémission complète est obtenue lorsque le nombre de blastes médullaires est inférieur à 5%. Après cette phase d'induction, la phase de consolidation a pour objectif de prévenir les rechutes, en poursuivant la chimiothérapie pour les patients atteints de LAM avec un bon pronostic après analyse cytogénétique. Dans ce cas, des cures répétées de traitement à la cytarabine à forte dose sont effectuées pendant 3 à 4 jours pendant 3 cycles. Pour les patients ayant un profil cytogénétique ou moléculaire de mauvais pronostic, une greffe allogénique de moelle d'un donneur compatible peut avoir lieu.

La chimiothérapie et l'allogreffe étant des traitements lourds, certains patients ne sont pas éligibles pour les recevoir, notamment les personnes âgées. L'alternative proposée pour ces patients depuis 2007 en France est un traitement à l'azacytidine (Vidaza®), un agent hypométhylant moins cytotoxique et mieux toléré que le traitement conventionnel. Malheureusement, ce traitement ne permet pas d'obtenir une rémission complète comparable à la chimiothérapie, mais permet néanmoins d'améliorer la qualité de vie.

Malgré l'efficacité de la chimiothérapie conventionnelle dans l'éradication des blastes leucémiques, ce traitement ne prévient pas efficacement les risques de rechute, qui restent très fréquentes, et sont le reflet d'une résistance de certaines cellules leucémiques au traitement. En effet, malgré les efforts mis en place depuis plusieurs années pour améliorer le traitement, seul 40% des sujets jeunes traités par chimiothérapie ont une survie globale à 5 ans (DiNardo et al., 2016). L'optimisation du traitement des LAM est donc nécessaire.

Grâce aux efforts mis en place pour mieux comprendre l'origine des LAM, des mutations récurrentes ont été identifiées et de nouvelles cibles ou stratégies thérapeutiques ont émergé. Ainsi, un grand nombre d'essais cliniques et de nouvelles molécules prometteurs ont été enregistrés ces dernières années, et sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau 6) (Bertoli et al., 2018).

Tableau 6 : Bilan des thérapies ciblées en cours de développement dans les LAM
 AMM = Autorisation de Mise sur le Marché, ATU= Autorisation Temporaire d'Utilisation. D'après Bertoli et al., 2018.

Cible	Traitement	Développement en France	Date d'AMM aux Etats-Unis
-------	------------	-------------------------	---------------------------

FLT3	Midostaurine Quizartinib Crenolanib Gilteritinib Sorafenib (en maintenance post-allogreffe ; traitement non approuvé dans la LAM)	AMM 2017 ATU nominative 2018 Phase 3 Phase 3	2017 2018
IDH2	AG-221 Enasidenib	ATU 2018	2017
IDH1	AG-120 Ivosidenib	Phase 3	2018
BCL-2	Venetoclax	Phase 3	2018
MCL-1	S63845	Phase 1	
CDK4/6	Palbociclib	Phase 3	
MDM2	Idasanutlin	Phase 3	
CD33	Gemtuzumab Ozogamycine SGN-CD33A Vadastuximab talirine BiTE CD33xCD3 AMG330 CAR-T cells	AMM 2018 Phase 3 (arrêtée) Phase 1 Etude pré-clinique	2017
Voie Hedgehog	Glasdegib	Phase 3	2018
CD123	SL-401 DART CD123xCD3 Flotetuzumab	Phase 2 Phase 1	

Avec l'ensemble de ces nouvelles molécules, l'idée de la thérapie ciblée commence à se concrétiser pour les LAM. Mais leur traitement reste un challenge, et pour poursuivre ces avancées, il est indispensable de continuer à étudier la biologie de ces hémopathies, afin d'améliorer le traitement pour les sous-groupes où la chimiothérapie conventionnelle n'apporte que peu de bénéfice et en cas de rechute, malheureusement encore trop fréquentes.

Au vu du rôle majeur de CHK1 dans la prolifération des cellules et dans la mise en place de la réparation des dommages de l'ADN, le ciblage de CHK1 dans le contexte des LAM a émergé.

V. Ciblage de CHK1 dans les LAM

1. Inhibiteurs de CHK1 en monothérapie dans les leucémies

En souhaitant identifier les tumeurs pour lesquelles l'utilisation d'inhibiteurs de CHK1 pourrait avoir un effet en monothérapie, Bryant et ses collaborateurs ont établi que les lignées cellulaires leucémiques ou de lymphomes étaient plus sensibles à l'inhibition de CHK1, en comparaison avec des lignées de cancer du côlon ou de poumon. En effet, l'inhibition de CHK1 par le V158411 induit une diminution de la prolifération des lignées cellulaires leucémiques et de lymphomes, ainsi qu'une fragmentation de l'ADN et la mort de ces cellules. L'analyse *in vitro* de la pharmacodynamique de cet inhibiteur a mis en évidence une diminution des niveaux protéiques de CHK1 et de la cycline B1 de manière dose-dépendante avec l'inhibiteur, ainsi qu'une diminution des phosphorylations de Cdc2 sur la Tyr15 et de H2AX sur la Ser139, perturbant le cycle cellulaire (Bryant et al., 2014).

Une autre étude conforte ces premiers résultats, puisque Iacobucci et ses collaborateurs ont montré sur des lignées cellulaires de Leucémies Aiguës Lymphoïdes que l'inhibition de CHK1 avec une autre molécule, le PF 00477736, réduit la viabilité de ces cellules, en induisant des dommages à l'ADN, l'apoptose, et en perturbant la voie CHK1-CDC25-Cdc2 et le cycle cellulaire. De plus, l'utilisation de cet inhibiteur *in vivo* permet d'améliorer la survie des souris xénogreffées avec des cellules leucémiques (Iacobucci et al., 2015).

Enfin, très récemment des auteurs ont identifié un nouvel inhibiteur sélectif et robuste de CHK1, le MU380, ayant un effet utilisé seul dans les Leucémies Lymphoïdes Chronique, indépendamment du statut p53, à la fois dans les lignées cellulaires, dans des cellules primaires de patients et dans des modèles de xénogreffe *in vivo* (Boudny et al., 2019).

Ces études supportent l'intérêt potentiel du ciblage de CHK1 dans les cancers hématopoïétiques, et montrent l'importance de poursuivre les recherches.

2. Inhibiteurs de CHK1 en combinaison avec un agent génotoxique dans les LAM

Les Leucémies Aiguës Myéloïdes étant classiquement traitées par chimiothérapie, la question d'utiliser une combinaison de traitement entre un agent génotoxique et un inhibiteur de CHK1 s'est posée.

Une première étude a montré qu'une invalidation de CHK1 en combinaison avec l'inhibiteur des topoisomérases, l'étoposide, avait un effet synergique pour diminuer la prolifération des cellules leucémiques exprimant la mutation FLT3-ITD (Yao et al., 2007). De plus, des études réalisées sur des lignées cellulaires leucémiques ainsi que sur de larges panels d'échantillons primaires de patients atteints de LAM ont révélé que les cellules provenant de patients avec un caryotype complexe présentaient un fort niveau d'instabilité génétique de manière endogène, et une activation constitutive des acteurs des points de contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, l'inhibition de CHK1 (avec l'UCN-01 ou AZD7762) combiné à la cytarabine (AraC) dans cette sous-catégorie de leucémies à caryotype complexe, entraîne une diminution du nombre de colonies formées, représentant le potentiel de prolifération de ces cellules

leucémiques (Cavelier et al., 2009 ; Didier et al., 2012). Une autre étude montre des résultats similaires sans discriminer les LAM à caryotype complexe, où il apparaît que l'inhibition de CHK1 (SCH900776) augmente l'effet anti-prolifératif de la cytarabine dans les lignées cellulaires et dans les échantillons primaires de patients atteints de LAM (Schenk et al., 2012).

En utilisant un inhibiteur de CHK1 différent (GDC-0575), un autre groupe de recherche montre que l'inhibition de CHK1 augmente la mort des cellules de LAM *in vivo* et *in vitro*, en combinaison avec l'AraC, mais n'affecte pas les cellules souches ou les progéniteurs normaux. De manière intéressante, des cellules leucémiques résiduelles quiescentes sont présentes après ce traitement et peuvent devenir sensibles au traitement lorsqu'elles sont contraintes à rentrer en cycle (*via* le G-CSF, facteur stimulant les colonies de granulocytes). Cette combinaison de traitement (AraC + CHK1 inhibiteur + G-CSF) ouvre les portes pour un traitement plus efficace des LAM en clinique (Di Tullio et al., 2017).

Pourtant, lors du passage du SCH-900776 en phase II des essais cliniques, aucune amélioration de la réponse au traitement n'a été observée entre les patients traités uniquement à la cytarabine ou ceux traités avec la combinaison des deux traitements (Webster et al., 2017), remettant en doute l'intérêt d'utiliser les inhibiteurs de CHK1.

Avec ces études, CHK1 apparaît donc comme une cible thérapeutique intéressante en combinaison avec des agents génotoxique dans les LAM, mais nécessite d'être plus étudiée.

3. CHK1, un nouveau marqueur pronostic et cible thérapeutique dans les LAM

Au sein de mon équipe de thèse, des travaux ont été menés avant mon arrivée afin de déterminer l'impact pronostic dans les LAM de l'expression de 72 gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, la stabilisation des fourches de réplication et la mise en place du point de contrôle de phase S. Cette étude fluidigm, réalisée sur une cohorte de 198 échantillons de patients atteints de LAM, a identifié *CHEK1* comme étant le gène ayant le plus fort impact pronostic parmi tous les gènes testés. J'ai contribué à la poursuite de cette étude lors de mon stage de Master 2 Recherche au sein de l'équipe et nous avons mis en évidence que la protéine Checkpoint kinase 1 (CHK1) est une protéine exprimée de manière hétérogène chez les patients atteints de LAM, et que **CHK1 est un facteur associé de manière très significative à un mauvais pronostic et une résistance face au traitement** à la cytarabine (AraC). De manière intéressante, nous avons montré par des tests de clonogénie que l'inhibition de CHK1 dans les cellules l'exprimant fortement, restaure la sensibilité de ces cellules au traitement à un niveau similaire à celles exprimant faiblement CHK1 (Figure 22) (David et al., 2016).

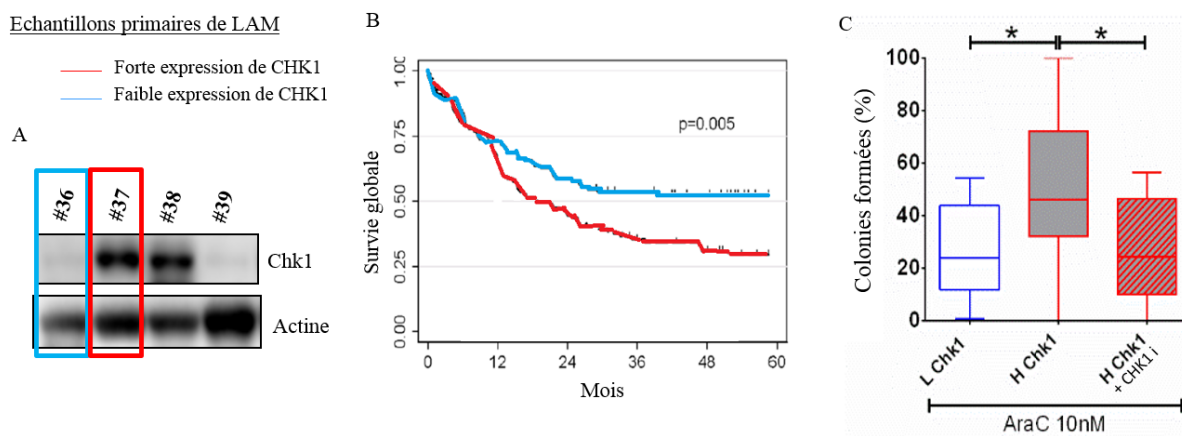


Figure 22 : Expression de CHK1 dans les LAM. A : Analyse par western blot des échantillons primaires de patients atteints de LAM. La discrimination des cellules exprimant faiblement ou fortement CHK1 se fait par rapport à la médiane d'expression, après quantification des western blots. B : Courbe de survie des patients atteints de LAM présentant un fort niveau (rouge) ou un faible niveau (bleu) de CHK1 par rapport à la médiane d'expression. C : Analyse des clones (groupe d'au moins 5 cellules) de cellules primaires de patients atteints de LAM formés après 7 jours de traitement à l'AraC seul ou en combinaison avec l'inhibiteur de CHK1 (SCH900776 à 250nM). La figure représente le ratio du nombre de clones comptés dans la condition non traitée. $n=22$ patients pour le groupe exprimant faiblement CHK1 (L CHK1) et $n=15$ patients pour le groupe exprimant fortement CHK1 (H CHK1). Adapté de David et al., 2016.

Bien que l'hétérogénéité de CHK1 ait été clairement documentée dans cette étude, le mécanisme par lequel le niveau protéique de CHK1 est contrôlé dans ce modèle leucémique reste à définir. Suite à ce projet, il était donc nécessaire d'établir les modes de régulation de la kinase CHK1 dans les LAM, permettant d'expliquer cette hétérogénéité d'expression. C'est dans cette optique que j'ai étudié au cours de mon stage de M2 Recherche plusieurs régulateurs de l'expression de CHK1, décrits comme capables de réguler les niveaux de CHK1 dans différents modèles. Après plusieurs mois d'étude, un de ces régulateurs s'est avéré particulièrement intéressant pour la régulation de CHK1 dans les LAM : « l'Ubiquitin Specific Peptidase 7 » (USP7/HAUSP).

La suite de ma thèse introduira la voie ubiquitine-déubiquitine, pour permettre la compréhension du rôle des Ubiquitines Spécifiques Protéases. La protéine USP7 sera ensuite décrite, en présentant cette déubiquitylase, sa régulation, ses rôles et son implication dans les cancers, notamment hématopoïétiques.

Partie 3 : La déubiquitylase USP7, régulateur de l'homéostasie et des cancers

I. Voie de dégradation ubiquitine-déubiquitine

1. [L'ubiquitylation des protéines](#)

Pour maintenir l'homéostasie cellulaire, une régulation fine de la stabilité des protéines, ainsi que l'élimination des protéines anormales, est nécessaire. L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle réversible, reposant sur l'action d'enzymes pouvant ajouter ou enlever l'ubiquitine (Ub).

1.1. Le système Ubiquitine-Protéasome

La dégradation d'une protéine par le système Ubiquitine-Protéasome (UbPr) fonctionne généralement en deux grandes étapes successives (Figure 23).

Dans un premier temps, l'ubiquitylation consiste en la **conjugaison covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine (Ub)**, sur un ou plusieurs résidus lysine de la protéine, *via* une cascade enzymatique impliquant 3 facteurs. La première enzyme, l'enzyme d'activation de l'ubiquitine E1, forme de manière dépendante de l'ATP, un pont covalent intermédiaire entre la glycine terminale de l'ubiquitine et le résidu cystéine du site actif de E1. L'ubiquitine est ensuite transférée jusqu'au résidu cystéine du site actif du deuxième facteur, l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2. Enfin, le troisième facteur, l'ubiquitine-protéine ligase E3, catalyse le transfert de l'ubiquitine sur le résidu lysine de la protéine substrat, formant ainsi un pont amide. Dans certains cas, la poly-ubiquitylation pourrait impliquer un facteur E4, permettant l'élongation de la chaîne d'ubiquitine selon un mécanisme encore mal connu. (Coux et al., 1996 - Hochstrasser et al., 1996 - Pickart et al., 2001 - Amerik et al., 2004 - Coux et al., 2011)

Dans cette première étape, le facteur E3 est responsable de la spécificité de l'ubiquitylation par le recrutement du substrat. (Coux et al., 2011)

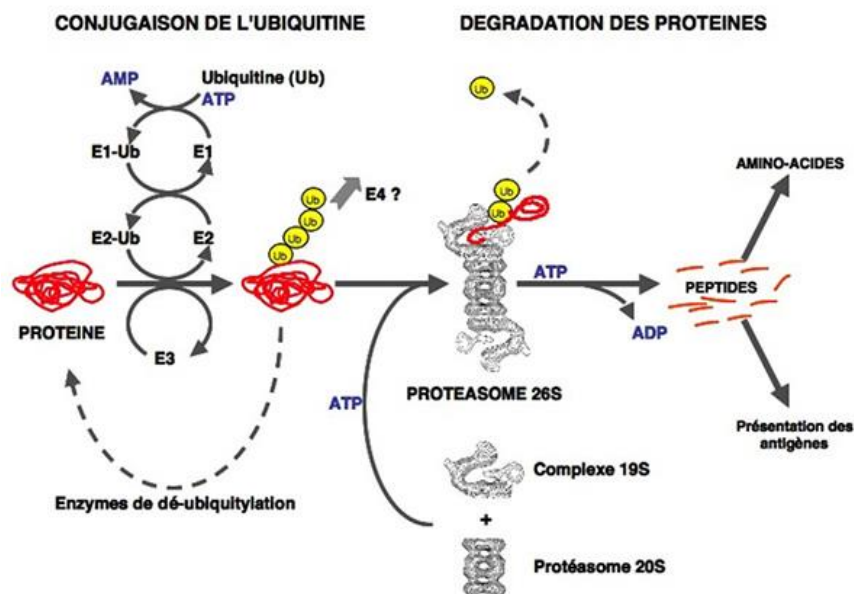


Figure 23 : Le système ubiquitine-protéasome
Représentation schématique du système ubiquitine-protéasome. D'après Coux et al., 1996.

Dans un second temps, le substrat ubiquitylé pourra être **relocalisé ou adressé**

au **protéasome** 26S où il sera dégradé. L'ubiquitine, quant à elle, sera recyclée. (Coux et al., 1996 ; Amerik et al., 2004)

Tout ce système Ubiquitine-Protéasome (UPS) repose justement sur la présence de cette ubiquitine.

1.2. L'ubiquitine

L'ubiquitine est une petite molécule de 8,5 kDa, composée de 76 acides aminés et caractérisée par la présence de deux résidus glycine en C-terminal et 7 résidus lysine. Cette molécule, très stable, est présente dans toutes les cellules eucaryotes, et est très conservée au cours de l'évolution, puisque l'ubiquitine humaine et celle de la levure partagent 96% d'homologie de séquence protéique. (Figure 24)

	10	20	30	40	50	60	70
Humain	MQIFVKTLTGKTITLEV	FP	SDTIENVK	AKIQDKEGIPPDQQR	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQESTLHLVLR	LRGG	
Levure	MQIFVKTLTGKTITLEV	F	sSDTIDNVK	S	KIQDKEGIPPDQQR	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQESTLHLVLR	LRGG

Figure 24 : Alignement des séquences de l'ubiquitine humaine et de la levure. Les trois résidus qui diffèrent entre les deux espèces sont indiqués en rouge. Adapté de Coux et al., 2011.

Le destin d'une protéine ubiquitylée dépend en partie de la longueur et de la configuration de la chaîne d'ubiquitine présente. En effet, les protéines peuvent être modifiées soit par une seule ubiquitine soit par des chaînes de poly-ubiquitine, sur un ou plusieurs résidus du substrat : on parle alors de **mono-ubiquitylation** et de **poly-ubiquitylation**, respectivement. Ces différents types d'ubiquitylation, appelés « ubiquitin code », ont des effets divers et spécifiques sur les protéines et la physiologie cellulaire.

a. La mono-ubiquitylation

La mono-ubiquitylation se fait grâce à la génération d'une liaison iso-peptidique entre le résidu glycine en C-terminale de l'ubiquitine (G76) et le groupement amine de la chaîne latérale du résidu lysine de la protéine cible. Les protéines peuvent ainsi être mono-ubiquitylées (une ubiquitine sur une lysine), ou multi-ubiquitylées (une ubiquitine sur plusieurs lysines). Cette mono-ubiquitylation peut avoir différentes conséquences mais est généralement impliquée dans la localisation intracellulaire des protéines ou leur activation. (Hicke, 2001 ; Coux et al., 2011).

b. La poly-ubiquitylation

Dans le cas de la poly-ubiquitylation, la première molécule d'ubiquitine est conjuguée à une lysine du substrat, puis l'élongation de la chaîne de poly-ubiquitine se fait par la formation d'une liaison isopeptidique entre la glycine C-terminale d'une nouvelle ubiquitine et une lysine de la molécule d'ubiquitine précédemment conjuguée. Comme 7 résidus lysines de l'ubiquitine sont exposés à sa surface, accessibles et disponibles, il peut se former différentes chaînes, de type et de topologie variés.

Les 7 résidus lysine impliqués dans le marquage à l'ubiquitine, sont les K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63, participant à la formation de chaînes d'ubiquitine d'orientation et de densité différentes, ayant chacune des fonctionnalités spécifiques. Cependant, l'étude protéomique de l'ubiquitylation chez la levure a révélé que certaines lysines semblent plus souvent impliquées dans ce processus que d'autres : $K48 > K63 > K11 > K33 = K29 > K27 > K6$ (Peng et al., 2003). Une chaîne de polyubiquitylation formée par des ponts sur la lysine 63 de l'ubiquitine induit préférentiellement un adressage de la protéine à la dégradation par la voie lysosomale (McKeon et al., 2015), alors que la polyubiquitylation formée par des ponts sur la lysine 48 de l'ubiquitine induit généralement la dégradation des protéines par le protéasome 26S. (Nijman et al., 2005 ; Coux et al., 2011)

La modification post-traductionnelle des protéines par l'ubiquitylation est donc un processus dynamique nécessitant l'intervention de plusieurs enzymes et la présence de l'ubiquitine. De par le rôle de ce système Ubiquitine-Protéasome (UPS) dans la régulation de protéines impliquées dans l'ensemble des processus cellulaires, des dysfonctionnements de ce système UPS participent au développement de pathologies. Une régulation de l'ubiquitylation est donc indispensable. Pour permettre une régulation de ce mécanisme, de manière similaire à la phosphorylation des protéines qui est en équilibre dynamique avec leur déphosphorylation, **l'ubiquitylation des protéines est en permanence contrecarrée par leur déubiquitylation**. Cette mission est effectuée par des enzymes connues sous le nom de déubiquitylases (DUB).

2. La déubiquitylation

2.1. Généralités

Les **déubiquitylases** (DUB) sont des protéases clivant l'ubiquitine des protéines cibles, après le dernier résidu d'ubiquitine (Gly76) et le groupement amine de la lysine du substrat (Wilkinson, 1997 - Coux et al., 2011). Les DUB sont impliquées dans différents processus cellulaires, tels que la réparation de l'ADN, la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, aussi bien en contrôlant le niveau ou la localisation intracellulaire de protéines régulatrices clés, ou en régulant l'activité de protéines cibles en altérant le nombre, la longueur ou le type d'ubiquitine.

Les déubiquitylases agissent à différents stades des processus d'ubiquitylation et de dégradation (Figure 25) (Hadari et al., 1992 - Coux et al., 2011) :

- Au stade **initial** en clivant les précurseurs de l'ubiquitine dans le but de générer de l'ubiquitine libre aux enzymes d'ubiquitylation
- Au stade **intermédiaire** en clivant de manière contrôlée l'ubiquitine déjà liée à son substrat protéique, permettant ainsi de réguler l'état d'ubiquitylation des substrats, et ainsi modifier leur devenir en modifiant leur stabilité, localisation ou activation.
- Au stade **final**, par la déubiquitylation des substrats pris en charge par le protéasome, permettant ainsi de recycler l'ubiquitine et maintenir un pool d'ubiquitine libre intracellulaire nécessaire au maintien de la protéolyse.

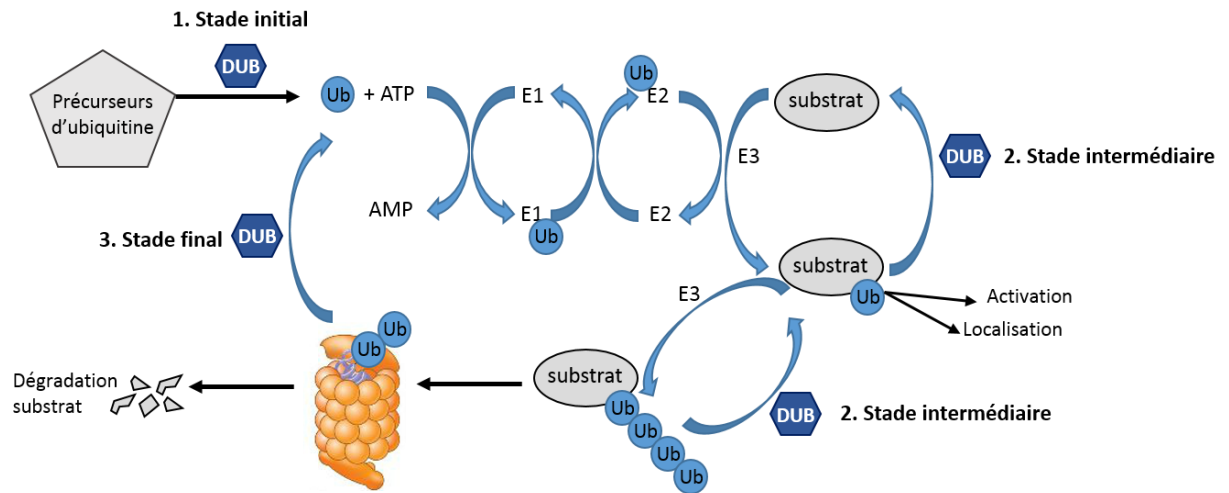


Figure 25 : Représentation schématique du système ubiquitylation-déubiquitylation. Par leur activité de déubiquitylation, les DUB génèrent des monomères d'ubiquitine, régulent l'état d'ubiquitylation des substrats et recyclent l'ubiquitine. Adapté de Coux et al., 2011.

Il existe au moins 98 DUB dans le génome humain, fonctionnant de manière très dynamique et spécifique. Bien qu'elles appartiennent au groupe des protéases, les DUB sont classées en **6 familles différentes** (Figure 26), basées sur leurs séquences et leurs structures : les **USP** (Ubiquitin-Specific Protease), les **UCH** (Ubiquitin Carboxyterminal Hydrolases), les **OTU** (Ovarian-Tumor Proteases), les **MJD** (Machado-Joseph Disease protein domain proteases), les **JAMM** (JAMM/MPN domain-associated metalloproteases), et les **MINDY** (motif interacting with Ub-containing novel DUB family). Toutes ces DUB sont des cystéines protéases, exceptées les JAMM, qui sont des métallos-protéases (Amerik et al., 2004 - Nijman et al., 2005 - Harrigan et al., 2018 - Pozhidaeva et al., 2019). Les USP et les UCH sont pour l'heure les protéases les mieux caractérisées. Les UCH sont principalement impliquées dans la maturation et le recyclage de l'ubiquitine, alors que les USP semblent jouer un rôle principalement dans la déubiquitylation de substrats spécifiques (Coux et al., 2011).

Pour mon introduction de thèse, l'intérêt sera porté sur les **Ubiquitin-Specific Protease (USP)**.

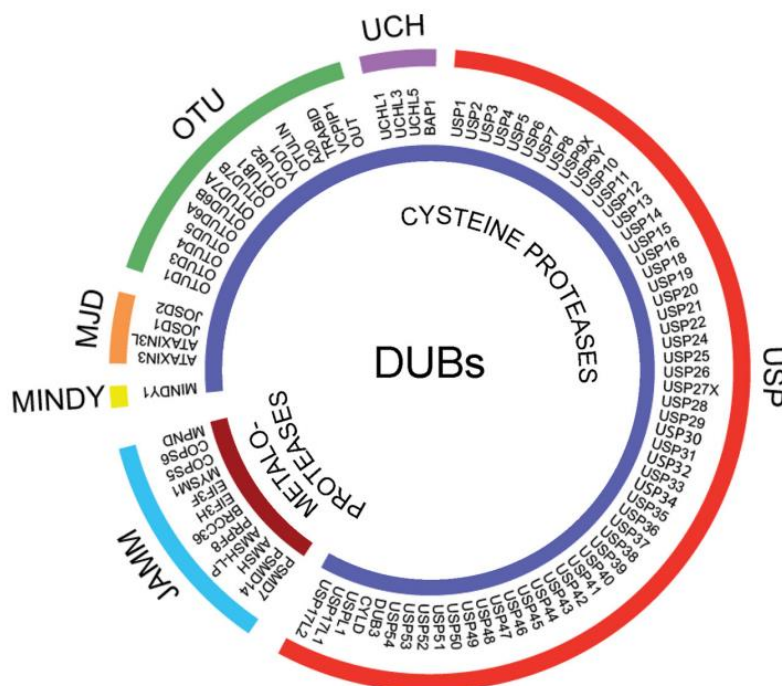


Figure 26 : Représentation des différentes classes de déubiquitylases humaines. Les DUB sont classées en 6 familles différentes : les USP (Ubiquitin-Specific Protease), les UCH (Ubiquitin Carboxyterminal Hydrolases), les OTU (Ovarian-Tumor Proteases), les MJD (Machado–Joseph Disease protein domain proteases), les JAMM (JAMM/MPN domain-associated metalloproteases), et les MINDY (motif interacting with Ub-containing novel DUB family). D’après Pozhidaeva et al., 2019.

2.2. Les Ubiquitin-Specific Proteases, USP

a. Description

Parmi ces DUB, la famille des **Ubiquitin-Specific Proteases (USP)** est la plus nombreuse, puisqu’elle compte 58 membres. La seule séquence conservée entre les différents membres des USP est la présence d’une poche catalytique unique, qui consiste en 3 résidus : Cys, His et Asp/Asn. L’absence d’autres domaines catalytiques offre une grande variabilité de séquence entre les différents membres de la famille des USP, allant de 300 à 800 acides aminés, et conférant des spécificités de substrats divers (Nijman et al., 2005).

b. Rôles des USP

Les USP sont des régulateurs de nombreuses voies cruciales pour la cellule, comme la survie cellulaire, la prolifération, la stabilité du génome ou encore le contrôle transcriptionnel. De nombreuses USP sont notamment décrites pour leurs rôles dans la modification de l’ubiquitylation des histones, cruciale pour la régulation de la transcription (Tableau 7), mais également dans l’activation des points de contrôle du cycle cellulaire, ou « checkpoint » en réponse aux dommages à l’ADN (Tableau 8).

Tableau 7 : Présentation de USP impliquées dans la régulation de l'ubiquitylation des histones. D'après Pinto-Fernandez A., 2016.

DUB	Histone (substrate)	Process
USP3	H2A, γ H2AX and H2B	Cell cycle and DNA double-strand break response
USP7	H2A and H2B	Gene expression
USP10	H2A (H2A.Z)	Transcriptional activation
USP12	H2A and H2B	<i>Xenopus</i> development
USP16	H2A	Cell cycle and gene expression
USP21	H2A	Transcriptional activation
USP22	H2A and H2B	Embryonic development and telomere integrity
USP29	H2A and H2B	DNA double-strand break response
USP36	H2B	Unknown
USP44	H2A and H2B	DNA double-strand break response (H2A) and stem cell differentiation (H2B)
USP46	H2A and H2B	<i>Xenopus</i> development
USP49	H2B	Co-transcriptional pre-mRNA processing

Tableau 8 : Présentation de USP impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN. D'après Pinto-Fernandez A., 2016.

DUB	Non-histone substrate	DDR pathway
USP1	FANCD2, FANCI and PCNA	Fanconi anemia, post-replication repair (PRR) and translesion DNA synthesis (TLS)
USP2a	Mdm2	p53
USP4	Auto-deubiquitylation and ARF-BP1	DSB-response (HR), p53
USP5	p53	p53
USP7	Mdm2, p53, Claspin, Chk1, Ring1b, Bmi1 and RNF168	p53, ATR-Chk1 and γ -H2AX (DSBs and SSBs)
USP8	BRIT1	BRIT1-SWI-SNF DSB-response
USP9X	Claspin	ATR-Chk1
USP10	p53 and MSH2	ATM-p53 and mismatch repair (MMR)
USP11	p53	DDR to etoposide
USP20	Claspin	ATR-Chk1
USP24	p53 and DDB2	p53-PUMA
USP28	Chk2 and 53BP1	Chk2-p53-PUMA
USP29	p53 and Claspin	p53 and ATR-Chk1

Plus généralement, toutes ces USP agissent au cours du cycle cellulaire, en régulant les points de contrôle (Figure 27), les mécanismes de réparation et de transcription.

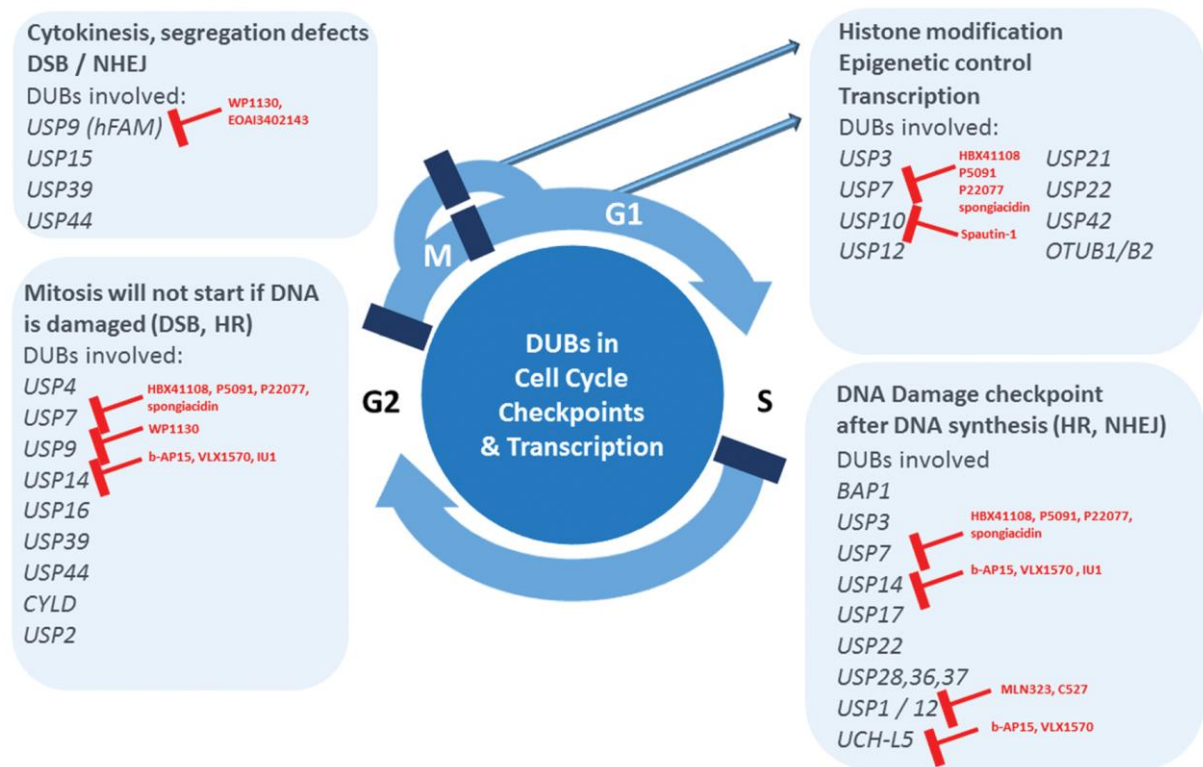


Figure 27 : Rôle des USP au cours du cycle cellulaire. Différents Ubiquitin-Specific-Proteases interviennent au cours du cycle cellulaire et des inhibiteurs peuvent être utilisés pour les cibler. D'après Pinto-Fernandez A., 2016.

La régulation par les USP de l'ensemble de ces voies est donc cruciale, puisqu'elles peuvent être impliquées dans les processus de développement de pathologies telles que les cancers lorsque leur niveau d'expression est altéré.

Parmi toutes ces USP, l'Ubiquitin Specific Peptidase 7 (USP7) a particulièrement attiré l'attention en raison de son rôle dans de nombreuses voies de signalisation et de son large éventail de substrat. Mon travail de thèse a donc porté sur cette déubiquitylase. Dans la suite de l'introduction de mon manuscrit, je présenterai la structure et l'activation d'USP7, sa régulation, ses différents rôles, son intérêt comme cible thérapeutique, et enfin son rôle particulier dans les cancers hématopoïétiques.

II. La protéine Ubiquitin Specific Peptidase 7

1. Découverte

La protéine Ubiquitin Specific Peptidase 7, aussi appelée Herpes-Associated Ubiquitin-Specific Protease (**USP7/HAUSP**), a été découverte, clonée et caractérisée par Everett et ses collaborateurs en 1997, et identifiée à l'origine comme un partenaire de la protéine ICP0/Vmw110 du virus Herpes Simplex (HSV) (Everett et al., 1997). Par la suite, de nouvelles interactions avec d'autres protéines virales comme Epstein-Barr nuclear antigen 1 EBNA1 (protéine du virus Epstein-Barr) ou encore LANA (protéine de Kaposi's sarcoma associated herpesvirus), lui ont valu son nom de Herpes-Associated Ubiquitin-Specific Protease (HAUSP).

En 2002, les travaux de Li et de ses collaborateurs ont mis en évidence que le rôle d'USP7 ne se résumait pas à son interaction avec des protéines virales, mais que cette déubiquitylase était impliquée dans la régulation de la dégradation de p53, induisant ainsi l'apoptose (Li et al., 2002).

2. Structure d'USP7

2.1. Description

Le gène codant pour la protéine USP7 est localisé sur le chromosome 16, locus 16p13.3, et la forme totale de la protéine est composée de 1102 acides aminés pour un poids moléculaire de 128kDa (Robinson et al., 1998 - Cheon et al., 2006). USP7 est une cystéine protéase, appartenant à la famille des Ubiquitin Specific Protease USP, qui hydrolise l'ubiquitine en cassant les ponts formés sur le résidu glycine carboxy-terminal de l'ubiquitine. USP7 est capable de déubiquityler les substrats mono- ou poly-ubiquitylés, et va préférentiellement cliver les lysines K11, K63 et K48 (Figure 28) (Ritorto et al., 2014 - Pozhidaeva et al., 2019).

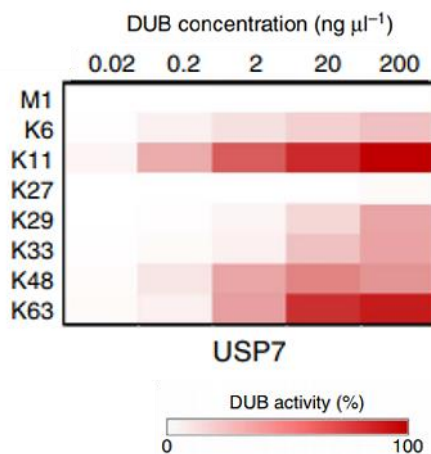


Figure 28 : Représentation de la spécificité des lysines préférentiellement clivées par USP7. Différentes concentrations de USP7 (0,02-200 ng/ μL) ont été incubées en triplet avec 1,46 mM de chaque type de chaîne (M1, K6, K11, K29, K33, K48, K63). L'analyse par spectrométrie MALDI-TOF DUB pour établir l'activité DUB est représenté ici sous une gamme de couleur allant du blanc (0% d'activité) à rouge foncé (100% d'activité). D'après Ritorto et al., 2014.

La protéine USP7 est exprimée de façon ubiquitaire et est hautement conservée chez les eucaryotes. Elle apparaît comme très conservée puisqu'elle partage 98.6% d'homologie de séquence avec la souris et le rat (Bhattacharya et al., 2018). Des études réalisées par Kon et ses collaborateurs confirment l'importance d'USP7, puisque la déplétion d'USP7 se révèle létale chez la souris au stade embryonnaire, entre les jours E6,5 et E7,5. L'étude de ces embryons de souris invalidées pour le gène *USP7* montre

également que la perte d'*USP7* induit une stabilisation de p53 ainsi qu'un arrêt de croissance, sans augmentation de l'apoptose. Dans cette même étude, la génération de souris doublement invalidées pour p53 et *USP7* ne permet pas de restaurer totalement le développement des embryons, montrant un rôle plus large d'*USP7* que sur la régulation seule de p53 (Kon et al., 2010).

2.2. Structure

Les nombreux rôles joués par *USP7* dans la cellule sont facilités par son architecture protéique en multi domaine. *USP7* est composée d'une chaîne poly-glutamine en N-terminal (poly Q), un domaine TRAF (Tumour necrosis factor (TNF) Receptor Associated Factor), un domaine catalytique (*USP7cd*) et un domaine C-terminal (Figure 29 et 30).

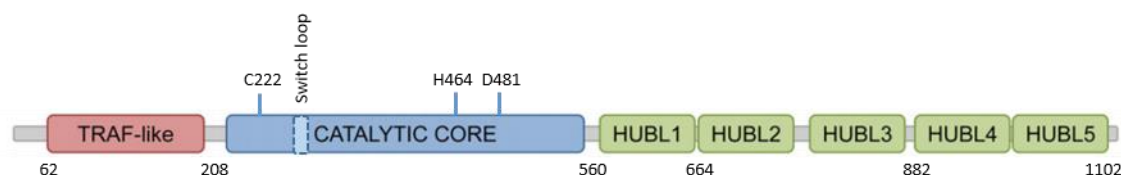
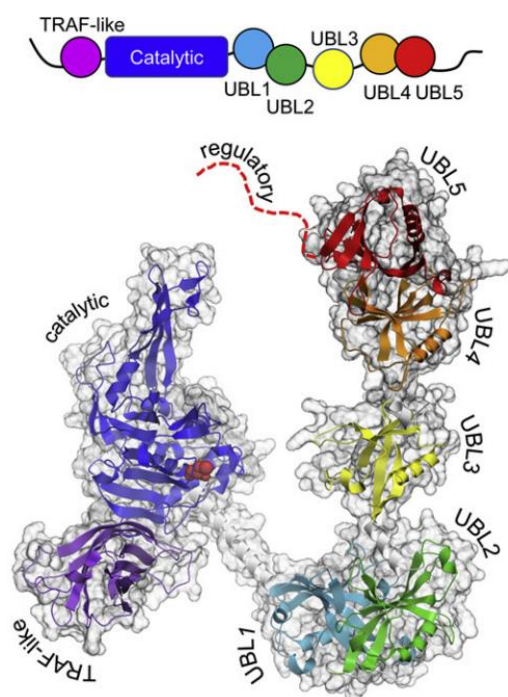


Figure 29 : Structure d'*USP7* et ses différents domaines. *USP7* possède un domaine TRAF (tumeur necrosis factor (TNF) receptor associated factor) (acides aminés 62 à 208) en partie N-terminale, particulièrement impliqué dans l'interaction d'*USP7* avec ses substrats. Le domaine catalytique (acides aminés 208 à 560), contient l'activité hydrolase. La région C-terminale d'*USP7* (acides aminés 560 à 1102), contient 5 ubiquitin-like (UBL) organisés en 2-1-2 unités UBL, facilitant l'interaction d'*USP7* avec de nombreux partenaires et le maintien de la conformation active d'*USP7*. Adapté de Tavana et al., 2017.

Figure 30 : Représentation schématique et structurale d'*USP7*. D'après Pozhidaeva et al., 2019.



Le **domaine N-terminal** d'*USP7* allant des acides aminés 1 à 208 contient une région **poly-Q** et un domaine **TRAF** (tumeur necrosis factor (TNF) receptor

associated factor). Ce domaine TRAF, allant des acides aminés 62 à 208, est particulièrement impliqué dans l'interaction d'USP7 avec ses substrats, notamment l'E3 ubiquitine ligase murine MDM2 et p53 (Hu et al., 2006 - Sheng et al., 2006), ou encore Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) (Holowaty et al., 2003a - Saridakis et al., 2005). Les substrats d'USP7 interagissant avec ce domaine TRAF présentent un motif commun P/AxxS, suggérant que les substrats d'USP7 sont en compétition de liaison. Ce domaine TRAF est aussi impliqué dans la localisation nucléaire d'USP7, avec un signal de localisation nucléaire potentiel (NLS) situé entre le domaine TRAF et le site catalytique (Holowaty et al., 2003b - Fernandez-Montalvan et al., 2007).

Le **domaine catalytique**, allant des acides aminés 208 à 560, contient l'activité hydrolase, avec les **3 résidus cystéine 223, histidine 464 et aspartate 481** (Figure 29). Lors de la liaison avec un substrat, la **cystéine 223** d'USP7 permet la liaison avec la partie C-terminale de l'ubiquitine. Des études *in vitro* ont également permis de mettre en évidence une région de « switch loop » entre les résidus 285 et 291, permettant le réarrangement du cœur catalytique C223 – H464 – D481 (Faesen et al., 2011). La poche catalytique d'USP7 va alors subir un changement conformationnel en hélice α lors de la liaison avec l'ubiquitine. En absence de liaison avec ses substrats, USP7 présente un domaine catalytique auto-inhibé (Rougé et al., 2016 - Kim et al., 2017 - Pozhidaeva et al., 2019).

La **région C-terminale** d'USP7, allant des acides aminés 560 à 1102, contient **5 ubiquitin-like (UBL)** organisés en 2-1-2 unités UBL, facilitant l'interaction d'USP7 avec de nombreux partenaires comme ATAXIN-1, ICP0, l'ADN méthyltransférases DNMT1, et possède aussi des sites de liaison additionnels à MDM2 et p53. En plus de son importance pour l'interaction avec ses partenaires, la région C-terminale permet le maintien de la conformation active d'USP7 (Bhattacharya et al., 2018).

3. Régulations d'USP7

Les études sur la régulation d'USP7 ne sont pas nombreuses, mais permettent de mettre en lumière des régulations d'USP7 à différents niveaux.

3.1. Régulation transcriptionnelle

Au niveau de la régulation transcriptionnelle d'USP7, les premières études réalisées en 2012 sur des cellules de cancer du côlon, ont montré que le facteur de transcription **STAT3** est capable de réguler négativement l'expression d'USP7 en se liant au promoteur d'USP7, inhibant ainsi la transcription *via* le recrutement de HDAC1 (Figure 31) (Yang et al., 2012). Cette étude montrait pour la première fois une régulation transcriptionnelle d'USP7.

Par la suite, deux facteurs de transcription induisant une régulation positive d'USP7 ont été mis en évidence. Tout d'abord en 2015, une étude menée sur des cellules de cancer du poumon a révélé que l'expression d'USP7 est augmentée par le facteur de transcription **FoxO6** (Forkhead box O6). Dans cette étude, les auteurs montrent que FoxO6 peut lier la région proximale du promoteur d'USP7, et que

la surexpression de FoxO6 augmente la transcription d'*USP7* (Figure 31) (Hu et al., 2015 – Bhattacharya et al., 2018). Récemment, Jin et ses collaborateurs ont mis en évidence que **NOTCH1** est également capable d'induire l'expression génique d'*USP7* dans des cellules de leucémies lymphoblastiques aiguës. De plus, l'expression d'*USP7* permet la mise en place d'une boucle positive de rétrocontrôle, où *USP7* est recrutée à la chromatine et stabilise NOTCH1 (Jin et al., 2019 – Shan et al., 2018). La question de la boucle de rétrocontrôle peut se poser également pour FoxO6. En effet, *USP7* n'est pour l'heure pas décrite pour réguler le facteur de transcription FoxO6, mais *USP7* est décrite comme étant un régulateur de l'activité transcriptionnelle de FoxO4, appartenant à la même famille de facteurs de transcription Forkhead box O (Van der Horst et al., 2006). Ceci nous laisse envisager qu'une boucle de rétrocontrôle positive pourrait éventuellement exister entre *USP7* et FoxO6.

Enfin, le dernier régulateur transcriptionnel d'*USP7* décrit est l'histone déméthylase **PHF8**. Dans une étude réalisée sur des lignées cellulaires de cancer du sein, Wang et ses collaborateurs montrent que la déplétion de PHF8 induit une diminution du niveau de l'ARNm d'*USP7*. De plus, PHF8 a été retrouvée au niveau du promoteur d'*USP7*, où PHF8 serait capable de déméthyliser le promoteur d'*USP7*, permettant son expression transcriptionnelle. Dans cette même étude, les auteurs montrent que *USP7* permet la déubiquitylation et la stabilisation de PHF8, montrant encore une fois une boucle d'autocontrôle (Figure 31) (Wang et al., 2016).

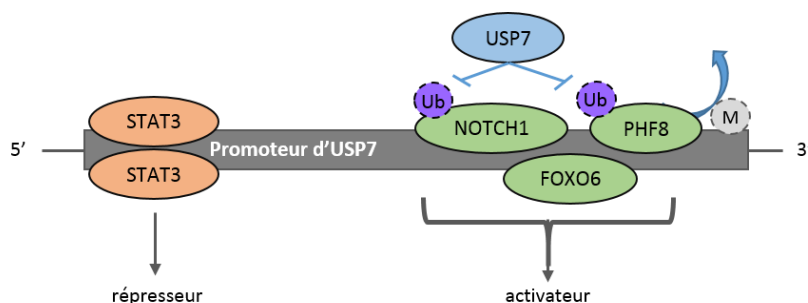


Figure 31 : Régulation transcriptionnelle de USP7. USP7 est régulée au niveau transcriptionnelle par différents acteurs, agissant comme répresseur ou activateur. Adaptée de Bhattacharya et al., 2018.

3.2. Régulation traductionnelle

Deux études rapportent un mécanisme de régulation de la traduction d'*USP7* dans les cellules de carcinome hépatique, où les **microARN-205** et **microARN-34a** régulent négativement l'expression d'*USP7*. L'utilisation de mimic-ARN (surexpression du miARN) induit une diminution du niveau

protéique d'USP7 due à la liaison du miRNA à la région 3'UTR de l'ARN messager d'USP7, et à l'inverse, l'utilisation d'un miARN anti sens (mise sous silence du miARN) dans ces mêmes cellules augmente le niveau protéique d'USP7. USP7 est donc régulée négativement par le miARN-205 et le miARN-34a dans ce contexte (Zhu et al., 2015 – Zhang et al., 2018).

Une autre étude met en évidence une régulation d'USP7 par les **microARN-338-3p** et **microARN-181**, et suggère que USP7 serait retrouvée surexprimée dans les lignées cellulaires et les échantillons primaires de Leucémies Lymphoïdes Chroniques dû à une dérégulation de ces deux miARN (Carrà et al., 2017).

3.3. Régulation post traductionnelle

La régulation post traductionnelle d'USP7 repose sur des modifications de types **phosphorylations et ubiquitylations**.

Plusieurs travaux ont en effet démontré que USP7 peut être phosphorylée sur les résidus sérines 18 et 963, et sur les résidus tyrosines 243, 878 et 947, et également être ubiquitylée sur les résidus lysines 443 et 869 (Figure 32) (Fernandez-Montalvan et al., 2007).

La **sérine 18** d'USP7 a été décrite comme phosphorylée par la casein kinase 2 (CK2), induisant une augmentation de l'affinité d'USP7 pour MDM2. Cette phosphorylation est contre balancée par la phosphatase PPMG1, qui déphosphoryle USP7, augmentant ainsi l'affinité d'USP7 pour p53 et induisant la dégradation de MDM2. Cette phosphorylation de la sérine 18 semble donc réguler la fonction d'USP7 (Khoronenkova et al., 2012).

Les phosphorylations sur les résidus **tyrosines 243, 878 et 947** sont quant à elles assurées par la tyrosine-kinase BCR-ABL, et permettent la régulation de la localisation nucléaire et de l'activité d'USP7. En effet, dans un contexte de Leucémie Myéloïde Chronique, BCR-ABL est capable de phosphoryler USP7 sur ces différents résidus, augmentant ainsi l'activité déubiquitylase d'USP7 sur le suppresseur de tumeur PTEN (Morotti et al., 2014).

La kinase responsable de la phosphorylation de la **sérine 963** dans le domaine UBL4 n'a quant à elle pas encore été décrite, mais cette phosphorylation pourrait avoir un rôle dans la régulation du changement de conformation d'USP7 rapprochant les domaines UBL avec le domaine catalytique. (Fernandez-Montalvan et al., 2007)

La **lysine 443**, située dans le domaine catalytique d'USP7, est un site de poly-ubiquitylation K63 par l'E3 ligase HectH9 en condition d'hypoxie, permettant la liaison avec HIF1- α . Suite à l'ubiquitylation d'USP7 sur ce résidu, HIF1 α sera alors déubiquitylée et stabilisée par USP7, permettant la transcription des gènes cibles de HIF1 α . Cette modification post-traductionnelle favorise donc l'activité d'USP7 (Wu et al., 2016).

La **lysine 869** quant à elle, a été décrite comme polyubiquitylée par l'E3 ligase TRIM27, permettant l'activité d'USP7 pour débubiquityler la protéine RIP1 (receptor-interacting protein 1), impliquée dans les voies d'induction de l'apoptose (Zaman et al., 2013). Se trouvant dans le domaine UBL3, l'ubiquitylation de cette lysine 869 pourrait avoir un rôle dans la régulation du changement de conformation d'USP7, jouant un rôle dans la stabilité de la kinase RIP1.

Enfin, la stabilité d'USP7 a été décrite comme régulée par ubiquitylation *via* l'E3 ligase Trip12. En effet, dans le cadre d'une étude protéomique, les auteurs de ces travaux ont identifié que les E3 ubiquitine ligases HUWE1, DCAF4 et Trip12 interagissaient avec USP7 (Sowa et al., 2009). Après utilisation de siRNA dirigés contre ces 3 protéines dans des cellules HEK293 et HeLa, seule l'inactivation de Trip12 induit une augmentation du niveau protéique d'USP7, sans impacter le niveau de son ARNm (Liu et al., 2016). Trip12 est en effet capable de lier le domaine TARF d'USP7, et ainsi poly-ubiquityler USP7 par liaisons K48, induisant sa dégradation par le protéasome. Le site précis de poly-ubiquitylation par Trip12 n'est pas encore déterminé, mais se trouverait dans la région UBL d'USP7 (Liu et al., 2016).

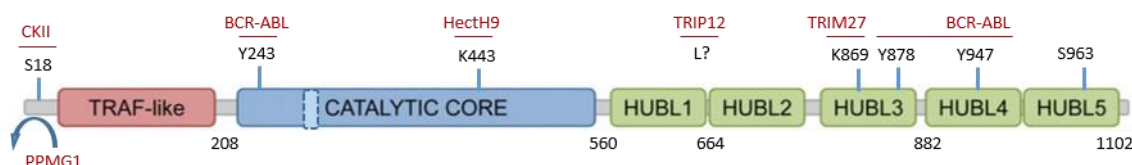


Figure 32 : Représentation schématique de la régulation par modifications post-traductionnelles de USP7. Les différents sites de modifications post traductionnelles d'USP7 décrits sont représentés ici. Adapté de Tavana et al., 2017.

Plusieurs autres sites ont été retrouvés *via* des approches de spectrométrie de masse comme sujets à des modifications post-traductionnelles, et sont regroupées sur le site internet PhosphoSitePlus, mais leurs rôles ne sont pas encore définis.

(en ligne <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=2971&showAllSites=true>)

3.4. Localisation

Une première étude réalisée en 2007 en utilisant différents variants d'USP7, a mis en évidence que le **domaine TRAF** d'USP7 était nécessaire et suffisant pour permettre la localisation nucléaire d'USP7 (Fernandez-Montalvan et al., 2007).

Bien que USP7 soit majoritairement localisée dans le noyau, un faible niveau d'USP7 est retrouvé dans le cytoplasme, montrant qu'USP7 est sujet à un trafic entre ces compartiments.

Deux protéines se liant à USP7 ont donc été décrites comme régulant sa localisation subcellulaire. **ICP0** a tout d'abord été décrit comme exportant USP7 du noyau vers le cytoplasme, où USP7 va lier et

déubiquityler le facteur TRAF6, inhibant la réponse immunitaire innée médiée par le facteur de transcription NFκB (Daubeuf et al., 2009). Une autre étude a permis de mettre en évidence une régulation de la localisation d'USP7, où, dans un contexte de Leucémie Myéloïde Chronique, USP7 est retrouvée exprimée à la fois dans le noyau et le cytoplasme, contrairement aux cellules normales de la moelle osseuse exprimant USP7 uniquement dans le noyau. En étudiant cette localisation d'USP7, les auteurs ont pu montrer que la kinase **BCR-ABL** phosphoryle USP7 dans le cytoplasme sur les tyrosines 243, 878 et 947, permettant sa localisation nucléaire. Une fois dans le noyau, USP7 va déubiquityler la phosphatase PTEN mono-ubiquitylée, induisant son export vers le cytoplasme et donnant le signal aux cellules leucémiques de proliférer (Morotti et al., 2014). De manière très intéressante, cette délocalisation de PTEN n'est pas retrouvée dans les cellules souches leucémiques où l'activité d'USP7 est inhibée par l'E3 ligase suppresseur de tumeur PML (promyélocytic leukemia gene).

Bien que majoritairement nucléaire, USP7 est sujet à un trafic subcellulaire permettant de réguler son activité déubiquitylase sur certains de ses substrats.

3.5. Activité

Par l'utilisation de différentes constructions de la protéine USP7, plusieurs travaux ont montré que le **domaine catalytique seul** d'USP7 ne présente qu'une **faible activité**, alors que l'expression de la forme totale de la protéine augmente cette activité catalytique de 100 fois. Les auteurs proposent donc qu'une autre région que le domaine catalytique d'USP7 joue un rôle dans la régulation de l'activité de cette déubiquitylase (Fernandez-Montalvan et al., 2007 - Wrigley et al., 2011). Par la suite, l'étude de la région C-terminale a montré qu'elle est composée de 5 domaines ubiquitin-like (UBL) organisés en 2-1-2 unités UBL, et ces deux derniers domaines UBL, UBL-4 et UBL-5 (UBL-45) se sont avérés essentiels pour l'activation d'USP7 (Faesen et al., 2011). En effet, cette partie C-terminale améliore l'activité catalytique en stabilisant la liaison entre l'ubiquitine et le domaine catalytique, grâce à un changement conformationnel d'USP7. De plus, des points de mutations individuels dans ce domaine C-terminal, sur les résidus I1100 ou I1098, ou bien la mutation de la cystéine 223 dans le domaine catalytique, abolissent l'activité catalytique d'USP7. Cette étude montre l'importance de cette interaction fine entre le domaine catalytique et les domaines UBL, donnant cette conformation de boucle à la protéine USP7. (Faesen et al., 2011)

USP7 se trouve donc, à l'état basal, en conformation « ouverte », catalytiquement inactive, et c'est la liaison de l'ubiquitine à la cystéine 223 du domaine catalytique d'USP7 ainsi que l'interaction avec le substrat qui entraîne différents **changements de conformation**, à la fois au niveau du domaine catalytique en induisant un remodelage du site catalytique (changement en hélice α permettant l'interaction entre les résidus histidine 464, aspartate 481 et cystéine 223) et en changeant la conformation d'USP7 pour stabiliser l'activité catalytique (Figure 33). Cet état basal inactif éviterait une déubiquitylation incontrôlée et inadaptée (Faesen et al., 2011 - Rougé et al., 2016 - Ozen et al., 2018).

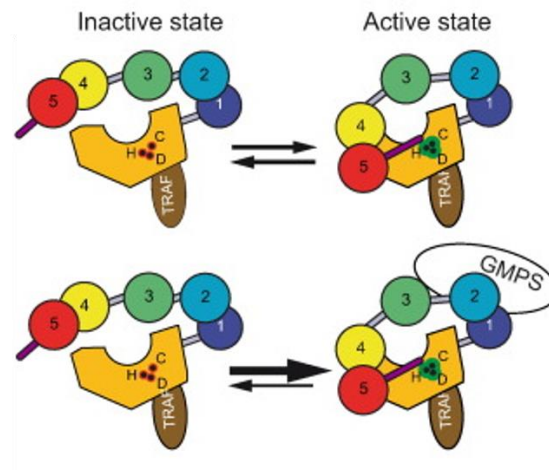


Figure 33 : Modèle de régulation de la conformation d'USP7 inactive et active. Pour être active, USP7 subit différents changements de conformation. Le site actif (résidus C, H et D) est représenté en rouge à l'état inactif et en vert à l'état actif. L'interaction entre les UBL-1,2,3 de USP7 et GMPS permet d'augmenter l'affinité entre le domaine catalytique et les UBL-45 d'USP7, stabilisant cette interaction et permettant l'hyperactivation d'USP7. D'après Kim et al., 2017.

Grâce à l'étude de la structure d'USP7 présentée précédemment, il est maintenant clairement établi qu'USP7 a besoin de la cystéine 223 du domaine catalytique ainsi que des domaines UBL-45 dans la région C-terminale pour permettre son activité catalytique optimale.

Pourtant, ce domaine UBL n'est pas constamment à l'état actif, laissant supposer que le mécanisme d'activation par les UBL est soumis à une régulation fine *in vivo*. Le premier candidat impliqué dans cette régulation a été l'enzyme métabolique guanosine 5'-monophosphate synthetase (**GMPS**), décrit comme capable de lier et activer USP7 chez la drosophile (Van Der Knaap et al., 2005) et l'Homme (Sarkari et al., 2009). Faesen et ses collaborateurs ont donc étudié le rôle de GMPS dans cette régulation des UBL, et ont pu mettre en évidence que les domaines UBL-1,2,3 servent de plateforme de liaison pour GMPS. Cette interaction entre les UBL-1,2,3 de USP7 et GMPS permet d'augmenter l'affinité entre le domaine catalytique et les UBL-45 d'USP7, stabilisant cette interaction et permettant l'hyperactivation d'USP7 (Figure 33) (Faesen et al., 2011 - Van Der Knaap et al., 2010).

Cette interaction entre USP7 et GMPS n'est pas constante, car l'ensemble du USP7 cellulaire n'est pas retrouvé en complexe avec GMPS, confirmant que USP7 n'est pas en permanence dans cet état « d'hyperactivation » (Van Der Knaap et al., 2010). Cette « hyperactivation » par GMPS semble donc, elle aussi, être régulée. Des études réalisées par Reddy et ses collaborateurs en 2014 ont justement montré que l'activité enzymatique de GMPS n'était pas essentielle pour cette hyperactivation, mais plutôt la localisation cellulaire de GMPS (Reddy et al., 2014). Cette localisation de GMPS est contrôlée *via* son ubiquitylation par l'E3 ubiquitine ligase TRIM21, séquestrant GMPS dans le cytoplasme dans

un contexte cellulaire normal en contrôlant sa monoubiquitylation en K182. Face à un stress génotoxique, GMPS est alors transportée dans le noyau, permettant l'hyperactivation d'USP7. Cette répartition cytoplasme/noyau de GMPS peut être considérée comme une balance de l'activité de la fraction nucléaire d'USP7 (Reddy et al., 2014). Par ailleurs, il est intéressant de noter que TRIM21 ne semble pas être un substrat d'USP7, ne permettant pas la mise en place d'une boucle d'autocontrôle de l'activation.

L'ensemble de ces études, mettent en lumière la régulation d'USP7 à différents niveaux, et montrent que cette protéine est en équilibre permanent entre un état actif et inactif.

4. Rôles d'USP7

Initialement décrite comme importante dans le contexte d'infection virale, USP7 est aujourd'hui décrite comme étant impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires, de manière directe ou indirecte, grâce à un éventail de substrats très large. En effet, USP7 est décrite comme liant des partenaires tels que des suppresseurs de tumeurs, des facteurs de transcription, des protéines associées à la chromatine, des régulateurs des points de contrôle du cycle cellulaire ainsi que des modulateurs épigénétiques, représentant des processus cruciaux dans **le maintien de l'homéostasie cellulaire ou l'oncogenèse** (Figure 34).

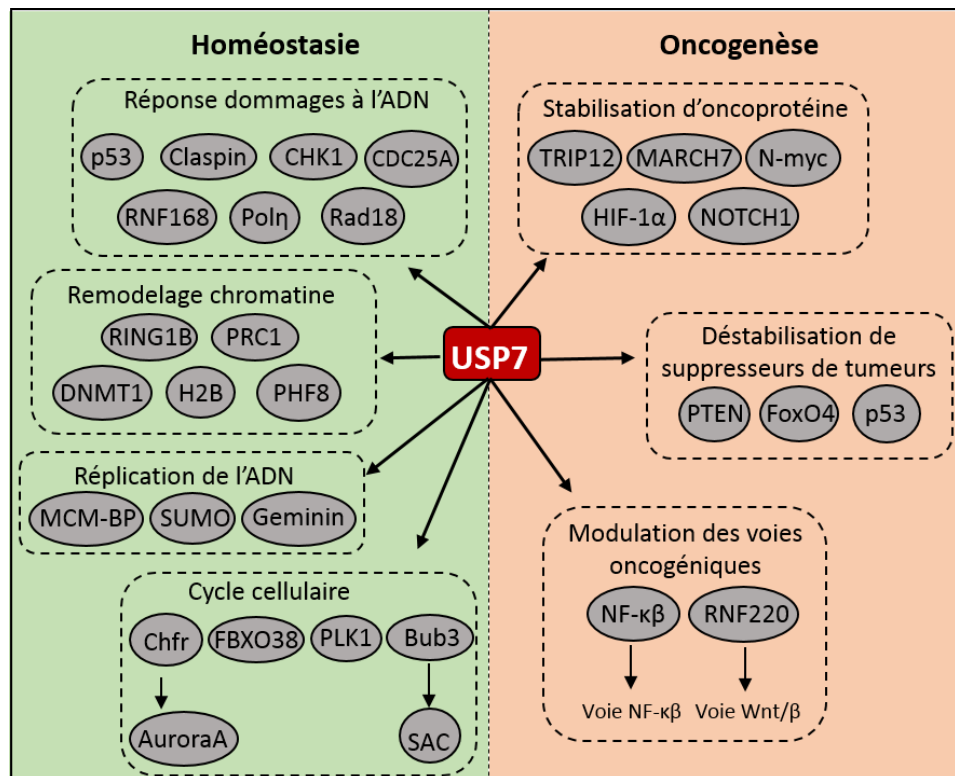


Figure 34 : Partenaires d'USP7 impliqués dans l'homéostasie ou l'oncogénèse. USP7 est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires, à la fois dans l'homéostasie et l'oncogénèse, grâce à un large éventail de substrats. Adapté de Basu et al., 2017.

Pour appuyer ce point, une étude protéomique effectuée à partir des cellules du cancer du côlon a montré que l'inactivation d'USP7 impactait le niveau d'au moins 36 protéines. Des composants de la machinerie de réplication, des protéines de liaison à l'ADN et l'ARN (ATP-dépendant RNA hélicase A), du cycle cellulaire (Calgranulin B), ainsi que des enzymes impliquées dans l'apoptose (ASP2) et le métabolisme (Phosphoribosylglycinamide formyltransferase) ont été retrouvées diminuées suite à l'utilisation d'un shARN dirigé contre USP7 pendant 48 h (Kessler et al., 2007). Ces résultats suggèrent que ces protéines sont plus rapidement dégradées ou moins rapidement synthétisées en absence de la déubiquitylase USP7. Pourtant, en comparant les résultats de cette étude avec les données de la littérature, même si les fonctions biologiques affectées sont similaires, aucun substrat décrit d'USP7 n'est retrouvé en commun, pas même ceux dont le lien biologique est largement établi comme par exemple pour p53/MDM2. On peut donc se demander si les protéines dont le niveau protéique a été retrouvé impacté dans cette étude sont bien directement liées à l'inactivation d'USP7.

Bien que cette dernière étude présentée soit quelque peu contradictoire avec les partenaires d'USP7 décrits dans la littérature, l'implication d'USP7 dans d'importants mécanismes cellulaires est établie. Dans cette partie du travail, je développerai donc les différentes implications décrites d'USP7 dans la réponse aux dommages de l'ADN, dans la régulation épigénétique et le remodelage de la chromatine, la réplication, le cycle cellulaire et enfin, dans l'oncogénèse (Figure 34).

4.1. Régulation de la réponse des dommages à l'ADN par USP7

Pour permettre le bon déroulement de la division cellulaire, il est indispensable pour la cellule de maintenir l'intégrité de son génome lors de la réplication ou face à des dommages de l'ADN. Si l'ADN est endommagé, les points de contrôle, ou « checkpoints », vont arrêter le cycle cellulaire et activer les voies de réparation de dommages à l'ADN (DDR). Cet arrêt du cycle ainsi que les réponses cellulaires qui en découlent nécessitent la présence de nombreuses protéines qui doivent être finement régulées. USP7 intervient dans la régulation de plusieurs d'entre elles.

a. USP7 et l'axe p53/MDM2

Un des premiers exemples décrit fut l'interaction entre USP7 et p53.

La réponse des dommages à l'ADN nécessite la présence du suppresseur de tumeur p53 (tumor antigen p53), qui est stabilisée et activée lors de la mise en place des points de contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN. Lors de conditions cellulaires normales, p53 est synthétisée en continu, mais maintenue à un faible niveau par l'ubiquitylase MDM2 qui dirige p53 vers la dégradation par le protéasome (Fuchs et al., 1998). Sous un stress génotoxique, ces mécanismes de régulation sont inversés, permettant à p53 d'induire la réparation des dommages ou l'apoptose. En effet, au niveau des sites de dommages, les kinases de réponse aux dommages ATM-CHK2 et ATR-CHK1 vont être activées, induisant la phosphorylation de p53. Ceci va permettre la séparation de p53 et MDM2, augmentant ainsi les niveaux de p53 et permettant la transcription de ses gènes cibles (Lakin et al., 1999) ainsi que son activité transcription-indépendante (Sengupta et al., 2005).

Cette régulation des niveaux de p53 et MDM2, se fait notamment grâce à la présence de la DUB USP7.

Dans un premier temps, USP7 a été décrite comme régulant directement p53 de manière antagoniste à MDM2, en le débubiquitylant, permettant ainsi sa stabilisation et son action en réponse à des dommages (Li et al., 2002). Mais par la suite, MDM2 a également été décrite comme un substrat d'USP7, régulant sa débubiquitylation et indirectement la dégradation de p53 (Li et al., 2004). USP7 est donc capable de stabiliser à la fois l'E3 ligase ainsi que son substrat en fonction du contexte cellulaire.

USP7 interagit avec ces deux substrats *via* le même domaine d'interaction, laissant imaginer une compétition d'interaction entre ces deux substrats. Mais des études ont montré que l'affinité de liaison d'USP7 en condition basale est plus forte pour MDM2 que pour p53 (Hu et al., 2006 - Sheng et al., 2006). En effet, en absence de stress cellulaire, USP7 va préférentiellement débubiquityler MDM2, assurant le maintien de p53 à un faible niveau.

La régulation de cette balance entre MDM2 et p53 est expliquée par plusieurs études. Premièrement, face à un stress tel que des dommages à l'ADN, les voies ATM/ATR vont permettre la phosphorylation de MDM2, perturbant son interaction avec USP7, et permettant ainsi à USP7 de lier, débubiquityler et stabiliser p53, et induisant l'auto-ubiquitylation et la dégradation de MDM2 (Holowaty et al., 2003b - Kim et al., 2017). Deuxièmement, en condition de stress, l'enzyme métabolique guanosine 5'-

monophosphate synthetase (GMPS) est transportée dans le noyau, lui permettant de se lier à USP7 et d'induire son « hyperactivation », facilitant la stabilisation de p53 au détriment de MDM2 (Figure 35) (Reddy et al., 2014). Enfin, dans un contexte cellulaire non stressé, Khoronenkova et ses collaborateurs ont montré que la stabilisation de MDM2 se faisait par un isoforme d'USP7 (USP7S) phosphorylé sur la sérine 18 par la kinase CKII (Khoronenkova et al., 2012). Cette phosphorylation stabilise USP7S, permettant la stabilisation de MDM2 et donc la dégradation de p53. Après des radiations ionisantes, l'isoforme USP7S est déphosphorylée par la phosphatase PPM1G dépendante de ATM, induisant la déstabilisation de USP7S et par conséquent la déstabilisation de MDM2 (Khoronenkova et al., 2012).

En ayant la **possibilité de stabiliser p53 et l'ubiquitylase MDM2**, USP7 a un rôle intéressant pour ajuster les niveaux et par conséquent l'activité de p53 sur les voies apoptotiques.

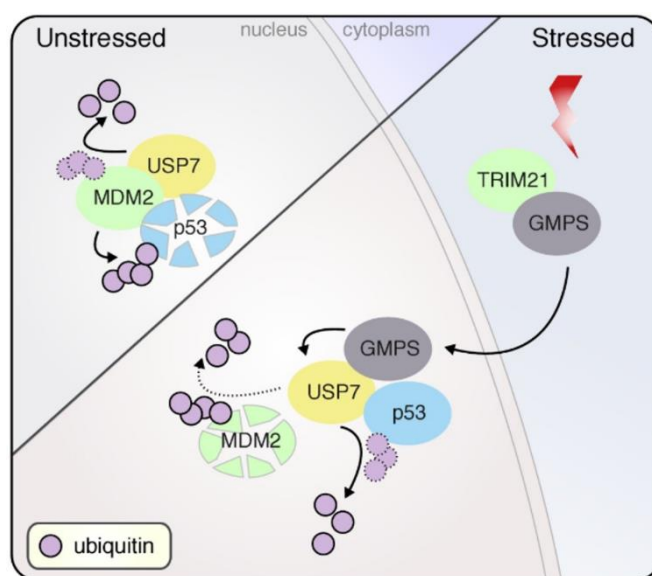


Figure 35 : Représentation schématique du rôle d'USP7 dans l'axe MDM2/p53. En fonction du contexte cellulaire, USP7 peut réguler la stabilité de MDM2 ou p53. D'après Rawat et al., 2019.

b. USP7 et l'axe CHK1

Lors de stress génotoxique, la réponse des dommages à l'ADN nécessite l'arrêt du cycle cellulaire, pour permettre la mise en place des mécanismes de réparation. Pour que cet arrêt du cycle ait lieu, l'activation de CHK1 *via* sa phosphorylation par ATR est cruciale, et nécessite la présence de la Claspine, protéine adaptatrice essentielle pour cette phosphorylation.

Dans ce contexte, USP7 a été décrit comme régulant indirectement CHK1. En effet, suite à l'ubiquitination de la protéine Claspine par le complexe SCF, Faustrup et ses collaborateurs ont démontré que USP7 interagit avec Claspine, permettant sa stabilisation et le maintien d'un niveau permanent de Claspine au cours de la réponse des dommages à l'ADN. USP7 régule donc le niveau protéique de la Claspine, induisant une augmentation de la phosphorylation de CHK1 en réponse à un stress génotoxique (Mailand et al., 2006 - Faustrup et al., 2009).

Mais USP7 est également capable de réguler directement l'ubiquitylation de CHK1. En effet, en 2014, Alonso-de Vega et ses collaborateurs indiquaient que dans des cellules U2OS d'ostéosarcome, USP7 contrôle la stabilité de la protéine CHK1 par déubiquitylation directe, indépendamment de la Claspin (Alonso-de Vega et al., 2014). Dans une étude plus approfondie, Zhang et ses collaborateurs montraient la même année que USP7 est en effet capable de déubiquityler CHK1 dans un modèle de cellules de cancer du sein, et ceci, notamment en réponse à des dommages. Leurs travaux montrent qu'en réponse à des dommages à l'ADN induits par radiations ionisantes, ATM activée phosphoryle et stabilise la protéine ZEB1, qui à son tour va directement interagir avec USP7, favorisant son activité de déubiquitylase sur CHK1, promouvant ainsi la réparation des dommages et la résistance des cellules cancéreuses (Figure 36) (Zhang et al., 2014b).

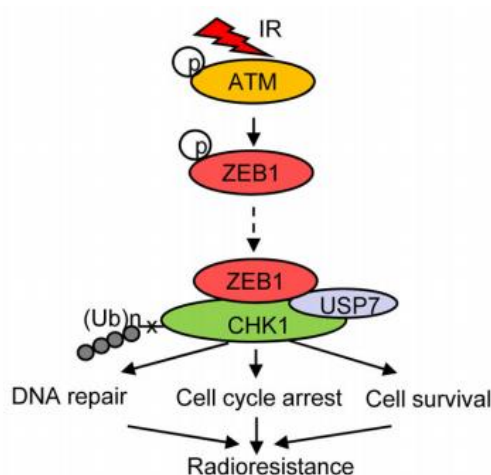


Figure 36 : Modèle de régulation et de radioresistance dans les cellules de cancer du sein impliquant USP7. En réponse à des dommages à l'ADN induits par radiations ionisantes, ATM phosphoryle et stabilise la protéine ZEB1, qui va directement interagir avec USP7. Ceci favorise l'activité déubiquitylase d'USP7 sur CHK1, permettant sa stabilisation ainsi que la régulation du cycle cellulaire et la réparation des dommages. D'après Zhang et al., 2014b.

Par ailleurs, dans ce contexte de dommages à l'ADN, CHK1 va phosphoryler CDC25A, induisant sa reconnaissance par les E3 ligases, son ubiquitylation et sa dégradation, entraînant notamment un arrêt du cycle cellulaire. USP7 a été retrouvée impliquée également dans cette régulation, car il apparaît qu'USP7 déubiquityle et stabilise CDC25A après induction de dommages par radiations ionisantes, dans des cellules de cancer du sein sur-exprimant la protéine BRE (Brain and Reproductive organ Express), favorisant ainsi la survie des cellules tumorales (Biswas et al., 2018).

Ces deux études montrant une régulation directe de CHK1 par USP7, notamment en réponse à des dommages à l'ADN, nous ont particulièrement intéressé pour nos études portant sur la compréhension de l'hétérogénéité d'expression de CHK1 dans les LAM. Je décrirai plus précisément cette hypothèse de travail dans le contexte scientifique de la partie 1 de mes résultats.

c. Réponse aux dommages de l'ADN par la déubiquitylation des histones

De plus, lors de la réponse aux dommages à l'ADN, la régulation de l'ubiquitylation des histones est une étape indispensable pour le recrutement des facteurs impliqués dans la réparation des dommages.

Suite à des dommages induits par des radiations ultraviolettes, l'E3 ubiquitine ligase RNF168 est notamment impliquée dans l'ubiquitination de γ H2AX et de H2A. Dans ce contexte, USP7 va interagir de manière directe *via* ses domaines UBL1,2 avec l'E3 ligase RNF168, la stabilisant, empêchant son auto-ubiquitylation et permettant l'ubiquitylation des histones H2AX et H2A et le recrutement des effecteurs de la réponse des dommages à l'ADN comme BRCA1 et 53BP1 (Zhu Q et al., 2015). Il pourrait être intéressant de déterminer si, dans ce contexte, USP7 fait également la balance entre l'E3 ubiquitine ligase et son substrat, mais pour l'heure rien ne prouve que H2A K13 ou K15, ubiquitylées par RNF168, peuvent être déubiquitylées par USP7 (Figure 37).

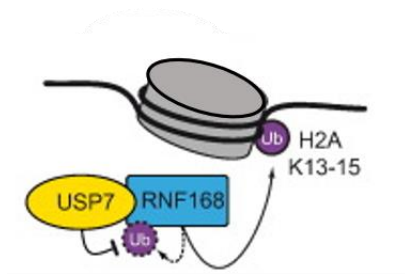


Figure 37 : Régulation de RNF168 par USP7. USP7 interagit avec l'E3 ligase RNF168, la stabilisant, empêchant son auto-ubiquitylation et permettant l'ubiquitylation des histones H2AX et H2A. Adapté de Kim et al., 2017.

d. Tolérance des dommages à l'ADN

En plus de ses rôles dans la réponse aux dommages à l'ADN, USP7 est également impliquée dans des mécanismes de tolérance des dommages, notamment en déubiquitylant directement l'ADN polymérase η (Pol η) (Qian et al., 2015) et Rad18 (Zlatanou et al., 2016), qui passent outre les lésions de l'ADN et permettent la tolérance au stress.

USP7 intervient donc dans les mécanismes de réponse des dommages à l'ADN à la fois en agissant dans le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire et dans la mise en place des effecteurs de la réponse aux dommages. Dans un contexte tumoral, USP7 pourrait donc être un régulateur important de la réponse aux dommages à l'ADN, permettant la mise en place de la réparation des dommages et la survie des cellules tumorales.

4.2. Modifications épigénétiques et remodelage de la chromatine

Le remodelage de la chromatine et les modifications épigénétiques sont des modes de régulation importants pour la transcription des gènes, ainsi que la réplication et la réparation de l'ADN, en régulant l'état d'ouverture de la chromatine, la méthylation de l'ADN ou la modification des histones.

a. USP7 : régulateur de la méthylation des histones

i. La méthyltransférase DNMT1 et son E3 ligase UHRF1

Un des rôles largement décrit d'USP7 est son action dans la balance entre l'E3 ligase MDM2 et son substrat p53. Mais USP7 semble interagir de manière similaire avec une autre E3 ubiquitine ligase, UHRF1, et son substrat DNMT1, impliquée dans le maintien de la méthylation des histones.

UHRF1 (ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1) a été décrite initialement comme se liant à la méthyltransférase DNMT1, permettant le maintien de la méthylation de l'ADN au cours des cycles de réplication (Bostick et al., 2007). En travaillant sur la régulation de la stabilité de DNMT1, Qin et ses collaborateurs ont montré que la dégradation de la méthyltransférase DNMT1 dépend de l'E3 ligase UHRF1 qui est capable de lier, ubiquityler et déstabiliser DNMT1, et à l'inverse, que USP7 stabilise DNMT1 en la déubiquitylant (Qin et al., 2011).

De manière similaire à la balance entre MDM2/p53, USP7 est donc capable de se lier à UHRF1 et le protéger de l'ubiquitylation (Qin et al., 2011) (Figure 38).

L'étude des sites de liaisons de UHRF1 et DNMT1 sur la protéine USP7 a montré que ces deux protéines interagissaient avec les mêmes domaines UBL d'USP7, en particulier les UBL1,2, suggérant une compétition de liaison entre ces deux partenaires. (Rothbart et al., 2013)

Pourtant, des travaux réalisés par Felle et ses collaborateurs en 2011 démontrent que USP7-DNMT1-UHRF1 forment un complexe trimérique sur la chromatine, où DNMT1 lierait USP7 sur son domaine C-terminal (UBL3), et UHRF1 lierait le domaine TRAF d'USP7, permettant ainsi à USP7 de stimuler l'activité enzymatique de DNMT1 et de réguler la stabilité de UHRF1 (Felle et al., 2011).

Au vue de ces études, il est certain que USP7 est capable de lier et réguler la stabilité de ces deux protéines. Par ailleurs, il reste à déterminer avec certitude si ces protéines sont en compétition de liaison, forment un trimère, ou si cette balance dépend d'un contexte cellulaire particulier permettant de décider entre la dégradation ou la protection de DNMT1.

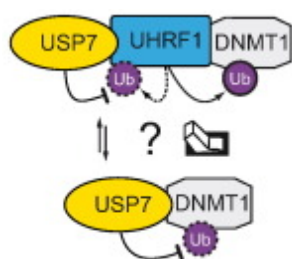


Figure 38 : Régulation de l'E3 ligase UHRF1 et de la méthyltransférase DNMT1 par USP7. USP7 forme un complexe avec l'E3 ligase UHRF1, mais également avec sa cible DNMT1. D'après Kim et al., 2017.

De manière intéressante, l'interaction entre UHRF1 et USP7 a été montrée comme régulée au cours du cycle cellulaire et notamment en mitose. Dans leur étude, les auteurs montrent que la phosphorylation en sérine 652 de UHRF1 réduit significativement l'interaction avec USP7, induisant une diminution de sa stabilité. UHRF1 phosphorylée en S652 a notamment été retrouvée en mitose, où la kinase spécifique

de la mitose CDK1-cycline B a été identifiée comme responsable de cette phosphorylation. L'utilisation d'un mutant non phosphorylable (S652A) rend UHRF1 plus stable, et impact le cycle en réduisant la prolifération cellulaire. Ces travaux proposent donc une signalisation cycle cellulaire dépendant, induisant la dissociation entre UHRF1 et USP7 en mitose, pouvant impacter la prolifération des cellules et la méthylation de l'ADN (Ma et al., 2012).

ii. L'histone déméthylase PHF8

Plus récemment, USP7 a été décrite comme capable de réguler indirectement la transcription des gènes *via* son activité déubiquitylase sur PHF8.

Plant Homeodomain finger-containing protein 8 (PHF8) est une histone déméthylase liant les histones H3K4me3. Un fort niveau de PHF8 a été décrit en lien avec plusieurs pathologies, et notamment les cancers. Dans leurs travaux, Wang et ses collaborateurs montrent que cette déméthylase est stabilisée par USP7 grâce à son activité déubiquitylase, induisant ainsi l'augmentation de la transcription de gènes cibles impliqués notamment dans le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, la survie cellulaire, la voie de p53 et même en régulant directement la transcription d'USP7 (Wang et al., 2016).

b. USP7 : régulateur de l'ubiquitylation des histones

i. Régulation indirecte des histones

Comme déjà décrit pour la régulation de RNF168 dans le contexte de réponse aux dommages de l'ADN (Zhu Q et al., 2015), USP7 est également capable de réguler l'ubiquitination des histones de manière indirecte *via* PRC1.

Polycomb Repressive complex 1 (PRC1) est un complexe E3 ubiquitine ligase à multiple sous unités, permettant la mono-ubiquitination de l'histone H2A sur la lysine 119, induisant la répression transcriptionnelle de gènes cibles.

USP7 a été décrite comme capable de stabiliser PRC1, puisqu'elle a été retrouvée associée de manière directe et indirecte avec la sous-unité RING1B du complexe PRC1, responsable de la monoubiquitination de l'histone H2A. Lorsque RING1B est seule, USP7 le stabilise *via* une interaction directe, dont le site est encore inconnu. Par ailleurs, lorsque RING1B forme un complexe avec BMI1, l'interaction avec USP7 nécessite la présence de la protéine SCML2, qui se lie à son domaine TRAF. USP7 peut alors réguler l'ubiquitination de RING1B, en le protégeant de son auto-ubiquitination, et contrôler ainsi positivement l'activité répresseur de PRC1 sur ses gènes cibles (Bie (de) et al., 2010 - Kim et al., 2017) (Figure 39).

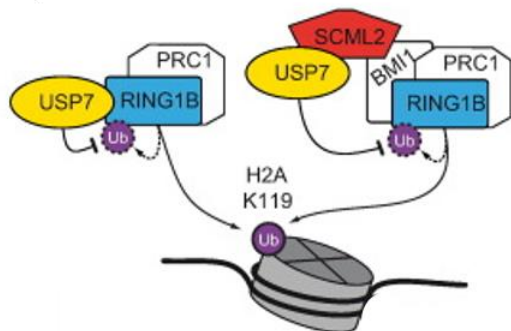


Figure 39 : Régulation du complexe PRC1 par USP7. L'ubiquitylation de H2A est contrôlée par la déubiquitylation et la protection du complexe RING1B et PRC1. USP7 est capable de stabiliser PRC1, en s'associant de manière directe et indirecte avec la sous-unité RING1B du complexe PRC1, responsable de la monoubiquitination de l'histone H2A. Adapté de Kim et al., 2017.

ii. Régulation directe des histones

Des études ont également montré que USP7 pouvait directement déubiquityler des histones, comme décrit pour H2B, où USP7 déubiquityle la lysine 120, indispensable pour l'ouverture de la chromatine lors de la réparation des dommages (Van der Knaap et al., 2005 - Van der Knaap et al., 2010 - Basu et al., 2017).

Avec ces différents travaux, USP7 se révèle être un régulateur important, pouvant être positif ou négatif, plus ou moins direct, de la régulation de la transcription des gènes, ouvrant ainsi l'éventail des voies indirectement régulées par USP7.

4.3. Rôle d'USP7 dans la réplication de l'ADN

Le contrôle de la réplication de l'ADN est crucial pour maintenir la stabilité génomique des cellules en division. Une activation inappropriée des origines de réplication ou une modification de la vitesse des fourches est associée à de l'instabilité chromosomique, une des caractéristiques des cellules cancéreuses.

Dans une étude datant de 2014, des travaux réalisés sur les cellules de colon HCT116 invalidées pour USP7 révèlent que ces cellules ont une phase G1 plus longue, probablement causée par une augmentation du niveau de p53, mais également une **accumulation de cellules en fin de phase S**, permettant d'émettre **l'hypothèse qu'USP7 jouerait possiblement un rôle dans la réplication** (Jagannathan et al., 2014).

Dans cette étude, les auteurs montrent que USP7 interagit directement *via* son domaine TRAF avec la protéine MCM-BP (MCM binding protein) (Jagannathan et al., 2014). Cette protéine a été montrée comme empêchant le recrutement de la protéine MCM (minichromosome maintenance complex) au niveau de la chromatine, perturbant les étapes tardives de la phase S du cycle cellulaire, mais le mécanisme permettant cette régulation restait obscur. Par l'étude des cellules HCT116 invalidées pour USP7, en plus de l'accumulation des cellules en fin de phase S du cycle cellulaire, les auteurs ont mis

en évidence que cette invalidation d'USP7 induisait une augmentation des niveaux de la protéine MCM sur la chromatine, causée par un défaut de dissociation de MCM à la chromatine en fin de phase S. Avec ces résultats les auteurs présentent une voie où USP7 pourrait aider MCM-BP à dissocier MCM de la chromatine à la fin de la phase S (Jagannathan et al., 2014), mais il reste encore à définir si les effets passent par une modification directe de la protéine MCM par USP7.

Une autre étude a permis d'identifier USP7 comme régulateur de la réplication de l'ADN, où USP7 est capable de stabiliser Geminin, une protéine inhibant les origines de réplication permises par Cdt1 (Hernandez-Perez et al., 2017).

De plus, des études ont mis en évidence le rôle d'USP7 dans la réplication, *via* son rôle de SUMO déubiquitylase.

SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) est une molécule ubiquitine-like pris en charge par des E3 ligases SUMO (PIAS), permettant la liaison covalente entre la SUMO et la protéine. La sumoylation ainsi que l'ubiquitylation des protéines est importante pour la réplication, puisque les protéines sont généralement retrouvées enrichies en SUMO mais faiblement ubiquitylées au niveau d'une fourche de réplication active. Au contraire, la situation est inverse sur la chromatine mature où un fort niveau d'ubiquitine et peu de SUMO sont retrouvées (Figure 40). Ces observations ont permis d'émettre l'hypothèse que des déubiquitylases pourraient être associées aux fourches de réplication et être responsables de ce phénomène (Smits et al., 2016).

Lecona et ses collaborateurs ont justement montré que USP7 est enrichie aux sites de réplication de l'ADN, et est nécessaire pour la progression des fourches de réplication et l'allumage de nouvelles origines de réplication. L'inhibition ou la déplétion d'USP7 limite la réplication de l'ADN, en réduisant la vitesse des fourches et l'allumage de nouvelles origines, et une augmentation de la sumoylation des protéines (particulièrement SUMO2) au niveau de la chromatine mature, mais une diminution de la sumoylation au niveau du réplisome. Ces résultats suggèrent que l'inhibition d'USP7 entraîne l'ubiquitylation des protéines sumoylées, induisant leur exclusion aux alentours de la fourche de réplication. Leurs expériences suggèrent également que USP7 collaborerait avec la protéine p97 pour contrôler les niveaux de SUMO/Ub aux fourches de réplifications, bien que le mécanisme soit aujourd'hui toujours obscur (Lecona et al., 2016). Avec ces travaux, Lecona et ses collaborateurs, montrent donc un rôle spécifique d'USP7 sur la régulation de la SUMO2 au niveau de la chromatine, et que USP7 est bien une SUMO déubiquitylase, puisque son inhibition induit une augmentation de la SUMOylation et de

l'ubiquitylation des protéines sur la chromatine mature (Figure 40). Il est maintenant nécessaire de déterminer les substrats d'USP7 sumoylés lors de la réplication.

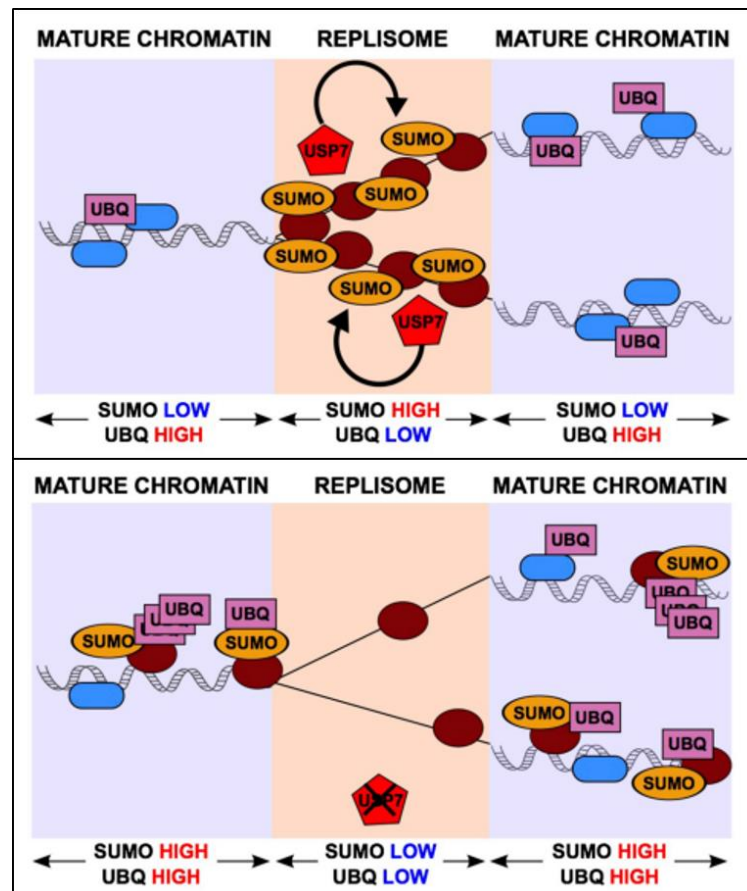


Figure 40 : Rôle d'USP7 au site de réplication de l'ADN. (Lecona et al., 2016). Haut : Modèle représentant l'action d'USP7 sur les facteurs de réplication SUMOylés, conservant un environnement riche en SUMO et faible en Ub autour des fourches de réplication. Bas : Lors de l'inhibition de l'USP7, les protéines SUMOylées associées au replisome augmentent rapidement leur ubiquitination, ce qui conduit à leur déplacement à la chromatine mature riche en Ub et loin des molécules d'ADN naissantes.

USP7 régule la réplication de différentes manières, et des modifications d'expression d'USP7 pourraient donc entrainer la progression de certains cancers en induisant une instabilité génomique.

4.4. Contrôle du cycle cellulaire

En plus de son rôle dans l'homéostasie cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN ou dans le remodelage de la chromatine, USP7 a été retrouvée impliquée dans la régulation du cycle cellulaire dans différents contextes.

Comme décrit dans la partie ci-dessus, différents travaux ont montré le rôle d'USP7 au cours de la réplication, et que son invalidation entraînait une accumulation de cellules en fin de phase S (Jagannathan et al., 2014). Mais les autres étapes du cycle cellulaire peuvent également être régulées par USP7.

Lors d'une étude effectuée sur la protéine du rétinoblastome Rb, un important régulateur du cycle cellulaire, notamment en phase G1, les auteurs montrent que la surexpression d'USP7 induit une accumulation des cellules en phase G1 du cycle cellulaire, au détriment des autres phases du cycle, possiblement *via* son activité déubiquitylase sur la protéine Rb (Bhattacharya et al., 2014). Ces travaux suggèrent un rôle d'USP7 dans la régulation de la **phase G1** du cycle cellulaire. Une autre étude effectuée sur des cellules HEK293 traitées à l'étoposide pour induire un stress génotoxique conforte ce nouveau rôle d'USP7 (Liu et al., 2016). En effet, dans cette étude l'invalidation par siRNA d'USP7 combinée à un traitement à l'étoposide entraîne une diminution significative du nombre de cellules en phase G1 du cycle cellulaire, et une accumulation des cellules dans les autres phases du cycle. Ces deux études attestent d'un rôle d'USP7 dans le cycle cellulaire non perturbé ou en réponse à un stress.

Au cours de la **mitose**, plusieurs études mettent en évidence un rôle d'USP7. Tout d'abord, Giovinazzi et ses collaborateurs ont mis en évidence que la déplétion d'USP7 altère la progression de la mitose en réduisant la stabilité de l'E3 ligase mitotique CHFR (checkpoint with forkhead and ring-finger), ayant pour conséquence l'accumulation de la kinase Aurora-A, substrat de CHFR, induisant l'apparition d'un fuseau mitotique multipolaire (Figure 41) (Giovinazzi et al., 2013). En effet, Aurora A étant impliquée dans la maturation des centrosomes, l'assemblage du fuseau bipolaire et dans la séparation des chromatides, un dérèglement du niveau protéique de cette kinase impacte directement les phases essentielles de la mitose. Dans un second papier, ces mêmes auteurs ont mis en évidence que l'invalidation d'USP7 induit un rallongement de la mitose, avec l'apparition d'anomalies mitotiques telles qu'une ségrégation anormale des chromosomes, une accumulation de micro-noyaux et une augmentation d'aneuploïdie. Ces défauts mitotiques dans les cellules invalidées pour USP7 seraient médiés par Bub3 (Budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog), composant clé du Spindle Assembly Checkpoint (SAC), polyubiquitylée et dégradée dans ce contexte cellulaire (Giovinazzi et al., 2014). Sans Bub3, le Spindle Assembly Checkpoint en métaphase ne pouvant se mettre en place, le complexe APC n'est donc plus régulé, et le contrôle du bon alignement des chromosomes n'est plus assuré (Figure 41). Dans ces deux études, les résultats sont obtenus indépendamment du statut p53 des cellules, excluant l'implication de cette voie.

Plus récemment, USP7 a de nouveau été impliquée dans le bon déroulement de la mitose, notamment dans le maintien du bon nombre de centrosomes dans la cellule (Yim et al., 2017). Dans ce travail, l'objectif était de mieux comprendre le rôle de la protéine 53BP1 (Tumor Suppressor p53-binding protein 1) au cours de la mitose, en dehors des dommages à l'ADN, et notamment en comprenant sa régulation par PLK1. Les auteurs ont pu mettre en évidence que 53BP1 et PLK1 co-localisent au niveau des centrosomes, et que 53BP1 est phosphorylée par la kinase PLK1 sur la sérine 380, permettant son interaction avec USP7 et sa stabilisation (Figure 41). Dans un contexte d'inactivation d'USP7 par shRNA, une augmentation du marquage péri-centrosomale est retrouvée, indiquant un nombre anormal de centrosomes et un mauvais déroulement de la mitose. Ceci passerait donc par la dégradation de 53BP1 qui ne pourrait plus former un complexe avec la protéine CENPF (centromere protein F), requise pour la séparation correcte des centrosomes et une bonne migration des chromosomes (Yim et al., 2017).

Récemment, une nouvelle étude a mis en évidence l'importance d'USP7 au cours de la mitose. Le but initial de cette étude reposait sur une meilleure compréhension des interactions d'USP7 et potentiellement l'identification de nouveaux substrats *via* une purification par affinité couplée à une étude par spectrométrie de masse (AP-MS) de USP7 taguée FLAG (ou β -galactosidase taguée FLAG pour le contrôle négatif), dans des cellules de cancer gastrique (Georges et al., 2019). Contrairement à l'étude protéomique présentée précédemment (Kessler et al., 2007) qui, après invalidation d'USP7, ne retrouvait aucun substrat déjà connu, dans cette étude de 2019, des protéines précédemment décrites pour interagir avec USP7 sont retrouvées comme les protéines GMPS, PPM1G, DNMT1 et TRIP12, validant ainsi leur méthode (Tableau 9).

Tableau 9 : Résultats de la purification par affinité couplée à une spectrométrie de masse pour USP7-FLAG. Sowa et al., 2009.

Identified proteins	Total Spectral Counts			Length (amino acids)	Peptide counts/length
	FLAG-USP7	FLAG- β GAL	CRAPome average		
USP7	2307	0		1102	2.093
GMPS	303	0	3.6	693	0.437
USP11	159	0	3.2	963	0.165
TRIP12	133	0	4.3	1992	0.067
DNMT1	188	0	3.7	1616	0.116
DDX24	126	0	3.4	859	0.147
PPIL4	80	0	4.7	492	0.163
DHX40	68	0	2	779	0.087
PPM1G	49	0	2	546	0.090
TMPO	68	0	13.6	694	0.098
FBXO38	54	0	0	1188	0.045
TCEAL4	24	0	2	215	0.112

D'autres partenaires non caractérisés auparavant ont également été trouvés, et les auteurs ont décidé de se focaliser sur l'interaction d'USP7 avec la protéine FBXO38, également détectée par Sowa et ses collaborateurs dans une précédente étude, mais non caractérisée (Sowa et al., 2009). Dans leur étude, Georges et ses collaborateurs démontrent que USP7 interagit avec FBXO38 *via* sa région NTD et son Ubl2, permettant la stabilisation de FBXO38 *via* l'activité déubiquitylase d'USP7. Peu de choses étant connues sur les fonctions de FBXO38, les auteurs ont réalisé une étude protéomique pour identifier des partenaires de cette F-box protéine. La Kinesin Family member 20B (KIF20B), essentielle pour l'achèvement de la cytokinèse, a été retrouvée comme interagissant avec FBXO38, et l'hypothèse émise par les auteurs était donc que FBXO38 pouvait réguler négativement l'expression de KIF20B. Pourtant, l'invalidation par siRNA de FBXO38 ou de USP7 induit une réduction de KIF20B, notamment au niveau du midbody, et une augmentation du nombre de cellules poly-nucléées. Ces résultats supportent un modèle où USP7 stabiliserait FBXO38 en le déubiquitylant, permettant la stabilisation de KIF20B, indépendamment d'un complexe SCF, assurant le bon déroulement de la cytokinèse (Figure 41). Les auteurs soulèvent également la question du grand nombre de substrats d'USP7, mettant en doute que le

phénotype observé sur les cellules poly-nucléées après invalidation d'USP7 soit dépendant de FBX038 et KIF20B.

USP7 semble donc impliquée dans la régulation de la mitose, *via* son activité déubiquitylase sur plusieurs substrats (Figure 41). Malheureusement, dans ces différentes études, la localisation précise d'USP7 au cours de la mitose n'a pas été étudiée, et seules des immunoprécipitations montrent une interaction entre USP7 et ses différents substrats.

USP7 est directement impliquée dans la régulation de différentes étapes de la mitose, *via* son activité déubiquitylase sur plusieurs substrats. Par ailleurs, des anomalies dans le cycle cellulaire, notamment des catastrophes mitotiques, des anomalies dans le nombre ou le positionnement des centrosomes comme décrit précédemment, sont retrouvées dans plusieurs cancers, montrant encore une fois l'importance d'une fine régulation du cycle cellulaire et le rôle potentiel que joue USP7 dans les cancers.

5. USP7 et cancers

De par son large éventail de substrats, USP7 a été impliquée notamment dans les troubles neurologiques, métaboliques, immunitaires et dans les cancers (Bhattacharya et al., 2018). En focalisant notre étude sur son rôle dans **les cancers**, USP7 est retrouvée en lien avec plusieurs d'entre eux, où une modification des niveaux d'USP7 serait directement corrélée au développement de plusieurs cancers et à un faible taux de survie globale (Figure 42 et Tableau 10).

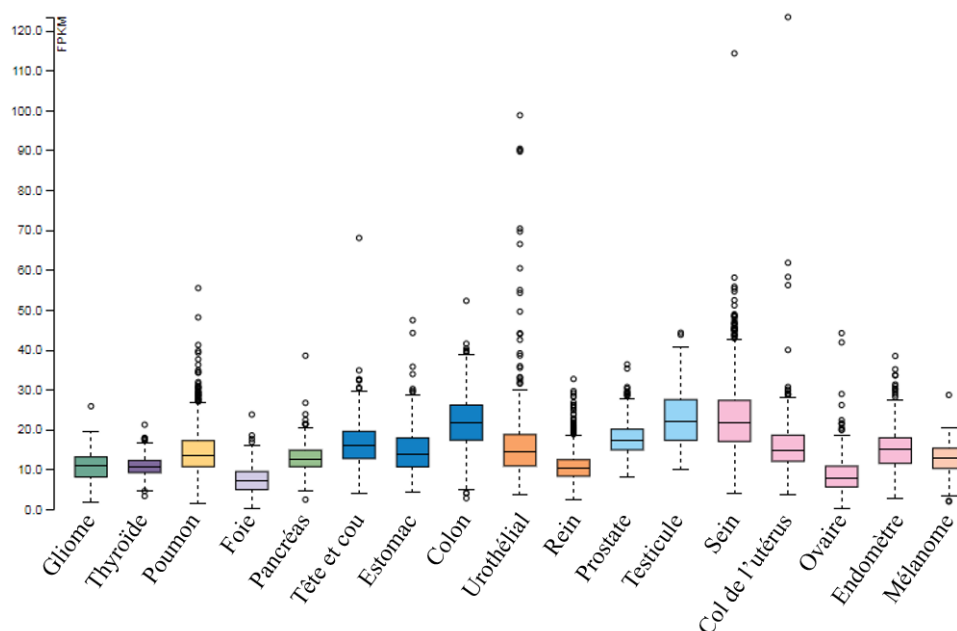


Figure 42 : Niveau d'expression de l'ARN d'USP7 dans plusieurs types de cancers. Données de RNA-seq dans 17 types de cancers générées par The Cancer Genom Atlas (TCGA), reportés sur la médiane FPKM (nombre de fragments par kilobase d'exon par million de lus). (Adapté de Human Protein Atlas – en ligne page consultée le 28/03/2019)

Tableau 10 : Liste des cancers dans lesquels USP7 est dérégulée. USP7 est retrouvée exprimée de manière hétérogène dans les cancers, en étant retrouvée surexprimée ou sous-exprimée par rapport à des tissus sains. Ses rôles suppresseurs de tumeur sont indiqués en bleu, ses rôles pro-tumoraux sont indiqués en rouge, et les rôles ambivalents sont indiqués en jaune.

Cancer	Statut d'USP7	Publication
cancer du côlon	Faible niveau d'USP7 protéique : résistance camptothecin et irradiation	Becker 2008
cancer du sein	Trop faible ou trop fort niveau protéique : associé à la résistance et progression des métastases	Hernandez-Perez 2017
cancer du poumon	Faible niveau protéique : développement du cancer Haut niveau ARN et protéique : phénotype malin	Masuya 2006 Zhao 2015
gliomes	Haut niveau ARN et protéique : mauvais pronostic	Cheng 2013b
Neuroblastome	Haut niveau ARN : mauvais pronostic	Fan 2013
cancer de l'ovaire	Haut niveau protéique : progression , métastases noyau lymphatique	Zhang 2016
carcinome hépatique	Haut niveau ARN : phénotype malin, croissance tumorale	Cai 2015
Leucémies Lymphoïdes Chroniques	Haut niveau protéique d'USP7	Agathangelou 2017
Leucémies Lymphoïdes T	Haut niveau ARN USP7	Shan 2018
Myélome Multiple	Haut niveau protéique : mauvais taux de survie global	Chauhan 2012

De manière intéressante, USP7 est à la fois un **oncogène** et un **suppresseur de tumeur** en fonction du contexte et des substrats régulés. Ici, le rôle d'USP7 dans les cancers est présenté, en expliquant son rôle dans la régulation d'onco-protéines et de suppresseurs de tumeur, ainsi que dans des voies oncogéniques.

5.1. Stabilisation d'onco-protéines

En plus de son rôle sur la régulation de la stabilité de MDM2, responsable du turnover du suppresseur de tumeur p53, USP7 régule d'autres onco-protéines.

Un fort niveau de l'onco-protéine **N-myc** ainsi qu'une amplification du gène *MYCN* ont été identifiés comme de mauvais pronostic chez les patients atteints de neuroblastomes. USP7 a justement été décrit comme interagissant avec ce facteur de transcription N-myc, le débiquitylant et le stabilisant dans des lignées cellulaires de neuroblastome. De manière intéressante, l'expression d'USP7 est significativement corrélée à l'activité transcriptionnelle de N-Myc. De plus, dans des modèles de xénogreffes murins, l'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre l'activité débiquitylase d'USP7 supprime significativement la croissance de lignées cellulaires de neuroblastome humain où *MYCN* est amplifié. Enfin, USP7 est retrouvée corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de neuroblastome. L'ensemble de ces résultats montrent un rôle crucial d'USP7 dans la régulation de la fonction de N-Myc

in vivo et suggèrent que l'inhibition d'USP7 pourrait devenir un traitement potentiel pour les tumeurs de neuroblastome où MYCN est amplifiée (Tavana et al., 2016).

USP7 a également été décrite comme régulant le facteur de transcription **HIF-1 α** . L'hypoxie au sein d'une tumeur va induire l'activité du facteur de transcription HIF-1 α , permettant l'expression de gènes responsables de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), des métastases ou de la résistance à la chimiothérapie. Une récente étude réalisée sur différentes lignées cellulaires de cancers solides a montré que l'hypoxie intra-tumorale induisait la polyubiquitylation d'USP7 sur la lysine 443 par l'E3 ligase HectH9. Cette polyubiquitylation K63 d'USP7 favorise son interaction avec HIF-1 α , et permet à USP7 de débubiquityler HIF-1 α . De plus, cette polyubiquitylation d'USP7 permet son interaction avec CBP et des composants du complexe Mediator, agissant comme une plateforme médiant l'initiation de la transcription des gènes cibles de HIF-1 α (Wu et al., 2016 - Basu et al., 2017). De manière intéressante, l'inhibition de l'E3 ligase HectH9 dans les lignées cellulaires de cancer du poumon induit une diminution de la poly-ubiquitylation d'USP7, et une diminution du niveau protéique de HIF-1 α , ayant pour conséquence d'annuler la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et réduire l'activité métastatique des cellules cancéreuses sous hypoxie. Le ciblage d'USP7 dans ces tumeurs hypoxiques ou dans les métastases semble donc être une piste thérapeutique intéressante (Wu et al., 2016).

De plus, dans les carcinomes hépatiques, USP7 est retrouvée plus fortement exprimée dans les cellules tumorales en comparaison aux tissus péri-tumoraux (Cai et al., 2015). Cette surexpression d'USP7 est corrélée à un phénotype malin, avec des tumeurs plus grosses et une mauvaise différenciation cellulaire. D'après l'étude, ces effets seraient causés par la stabilisation de **Trip12** (Thyroid Hormone Receptor-interacting protein 12) par USP7, induisant l'inactivation de p14^{ARF} et promouvant la progression des cancers hépatiques.

Comme décrit précédemment, USP7, recrutée à la chromatine, peut également stabiliser le facteur de transcription **NOTCH1**, un oncogène majeur dans les Leucémies Lymphoblastiques Aiguës T (Jin et al., 2019 - Shan et al., 2018).

Enfin, dans une étude portée sur le cancer ovarien, les auteurs ont pu montrer que USP7 stabilisait l'E3 ubiquitine ligase **MARCH 7** (Membrane associated RING-CH protein 7) favorisant la prolifération et l'invasion de la lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien et que la forte expression de ces deux protéines est corrélée à la présence de métastases chez les patients, et donc un mauvais pronostic de survie (Zhang et al., 2016).

Avec ces différentes études, USP7 apparait comme un régulateur de différents types d'onco-protéines dans plusieurs cancers (Figure 34), plaçant cette débubiquitylase comme un nouveau marqueur pronostic et une potentielle cible thérapeutique.

5.2. Exclusion nucléaire de suppresseur de tumeurs

En plus de ce rôle, USP7 est aussi décrit comme régulant négativement des suppresseurs de tumeur *via* leur exclusion nucléaire (Figure 34).

Un des suppresseurs de tumeur, dont la localisation subcellulaire est largement médiée par USP7, est **PTEN** (phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10). PTEN est une phosphatase impliquée dans diverses fonctions dépendantes de sa localisation. Lorsqu'elle est nucléaire, PTEN est un suppresseur de tumeur essentiel, et son import dans le noyau est médié par sa monoubiquitination par l'E3 ligase NEDD4-1 (Songs et al., 2012).

Dans des modèles de cancer de la prostate et de Leucémies Aiguës Promyélocytaires, USP7 a été retrouvée surexprimée et corrélée à une réduction de la fraction de PTEN nucléaire. En effet, PTEN monoubiquitylée dans le noyau est pris en charge par USP7 qui le débubiquityle, induisant l'exclusion nucléaire de PTEN. L'exclusion nucléaire de ce suppresseur de tumeur permet la progression du cancer de la prostate (Song et al., 2008). Cette régulation est par ailleurs retrouvée dans les Leucémies Myéloïdes Chroniques, où BCR-ABL favorise la débubiquitylation de PTEN par USP7, induisant son exclusion nucléaire (Morotti et al., 2014). De plus, dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes, NPM1 muté (nucléophosmine) inhiberait la débubiquitylation de PTEN par USP7 à la fois nucléaire et cytoplasmique, induisant tout de même la rétention de PTEN dans le cytoplasme, sa polyubiquitylation et sa dégradation (Noguera et al., 2013).

Ces études permettent de mettre en évidence que USP7 régule la localisation de PTEN dans différents types de cancers, induisant son exclusion nucléaire et l'empêchant d'agir en tant que suppresseur de tumeur.

USP7 régule également le transport subcellulaire de **FoxO4** (Forkhead box O4), un facteur de transcription important dans la voie de régulation du cycle cellulaire, la résistance au stress oxydatif ainsi que la réponse à l'hypoxie. En réponse au stress oxydatif, FoxO4 est mono-ubiquitylé, induisant sa relocalisation dans le noyau et augmentant ainsi son activité transcriptionnelle. Pour contrôler cette activité, USP7 peut retirer la mono-ubiquitine de FoxO4, l'excluant ainsi du noyau au détriment de l'activité transcriptionnelle de ce facteur (Van der Horst et al., 2006).

5.3. Modulation des voies oncogéniques

USP7 a également été décrite pour jouer un rôle dans les voies de signalisation NF- κ B et la voie Wnt/ β -catenin (Figure 34), caractéristiques de certains cancers.

NF- κ B est un régulateur clé de la réponse immunitaire, responsable de la transcription de centaines de gènes impliqués dans l'inflammation et l'immunité. De plus, une activation constitutive de NF- κ B est une caractéristique de nombreuses tumeurs hématopoïétiques et solides (Basu et al, 2017). L'activité de NF- κ B est sous le contrôle de différents facteurs, notamment son statut d'ubiquitylation. USP7 a été montré comme un régulateur de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B en favorisant sa localisation

nucléaire. La perte d'USP7 conduit à une augmentation de l'ubiquitylation de NF- κ B, induisant sa perte au niveau des promoteurs et donc une diminution d'expression de ses gènes cibles (Colleran et al., 2013).

La voie **Wnt/ β -catenin** quant à elle joue un rôle crucial dans l'embryogenèse, ainsi que dans la maintenance et la régénération des tissus. Le lien entre la dérégulation de cette voie et la tumorigenèse a été établi, notamment dans le cancer du côlon. Un régulateur de cette voie est l'E3 ligase RNF220 qui, au lieu d'ubiquityler et déstabiliser β -catenin, va favoriser sa stabilisation. Cette fonction de RNF220 est possible grâce à son association avec USP7, permettant la stabilisation de β -catenin et induisant la signalisation Wnt (Ma et al., 2014).

6. Inhibiteurs d'USP7

De par son rôle décrit précédemment dans ces nombreuses voies cellulaires et ces nombreux cancers, USP7 a émergé comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle, et l'intérêt pour le développement d'inhibiteur spécifique a grandi.

Le premier inhibiteur d'USP7 a été décrit en 2009 par Colland et ses collaborateurs. La molécule **HBX 41,108** a été montrée comme inhibant l'activité déubiquitylase d'USP7, induisant la stabilisation de p53 et inhibant la croissance des cellules de cancer du côlon HCT116, comme obtenu par l'utilisation d'un siARN dirigé contre USP7 (Colland et al., 2009). Dans leurs travaux, les auteurs montrent que le HBX 41,108 interagit préférentiellement avec une poche hydrophobe, représentée par les résidus Val256, Phe283, Trp285, His294, Leu299 et Val302, proche de la liaison à l'ubiquitine. Cette liaison permettrait de moduler l'activité catalytique d'USP7 (Colland et al., 2009 - Zhou et al., 2018). Mais, plus tard, une étude de screening sur l'activité des DUB et la spécificité de leurs inhibiteurs a montré que le HBX 41,108 est peu spécifique d'USP7, même à de faible dose (Figure 44), touchant un grand nombre d'autres DUB (Ritorto et al., 2014).

Par la suite, deux nouvelles molécules ont été identifiées par screening, **HBX19,818** et **HBX28,258**. Ces composants inhibaient respectivement l'activité d'USP7 avec un IC₅₀ de 28,1 et 22,6 μ M (Reverdy et al., 2012). HBX19,818 en liant directement la Cys223 d'USP7, permet l'inhibition de son activité, notamment vérifiée par la dégradation de MDM2 (Reverdy et al., 2012).

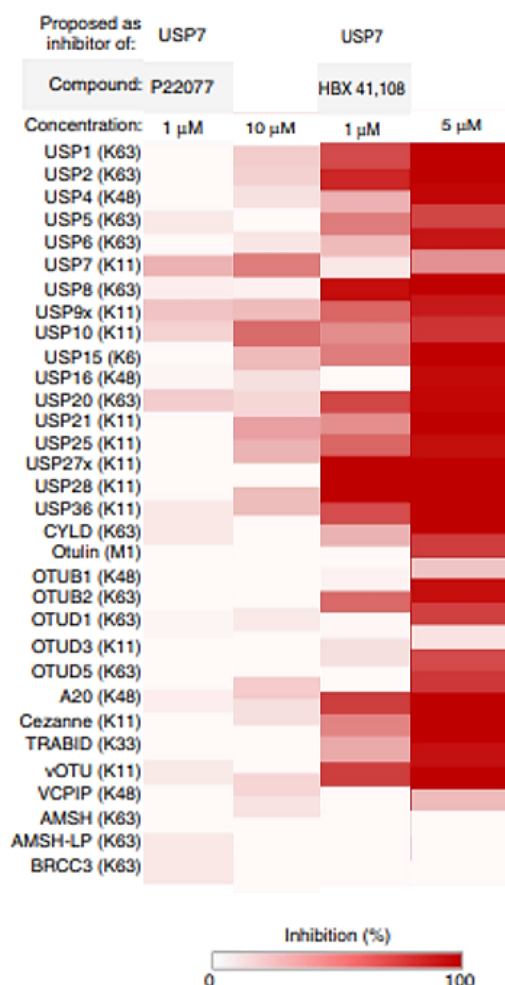
Une compagnie pharmaceutique américaine a par la suite développé un nouvel inhibiteur, ciblant à la fois USP7 et USP47, mais à des IC₅₀ plus faibles que les molécules précédentes (IC₅₀ de 4.2 μ M pour USP7 et 4.3 μ M pour USP47) (Weinstock et al., 2012). Ce composé, le **P5091**, permet également la dégradation du substrat d'USP7 MDM2, d'inhiber la prolifération des cellules HCT-116 (Weinstock et al., 2012), et induit l'apoptose des cellules de myélomes multiple résistantes aux thérapies conventionnelles telles que le bortezomib (Chauhan et al., 2012).

Ces deux derniers composants, le HBX19,818 et le P5091, étant très peu solubles, l'efficacité lors de tests *in vivo* est donc limitée, nécessitant l'identification de nouvelles molécules.

Via deux études, dont une basée sur l'activité chimique, et l'autre basée sur l'identification d'un analogue au P5090 plus soluble et plus efficace, un nouvel inhibiteur a été trouvé : le **P22077** (Altun et al., 2011 - Weinstock et al., 2012). Le P22077 est une petite molécule capable de se lier à la cystéine 223 permettant l'activité catalytique d'USP7, et mimant l'interaction entre la queue UBL de la protéine et le site actif, induisant donc un changement conformationnel d'USP7 mais bloquant son activation (Pozhidaeva et al., 2017). Le P22077 est pour l'heure l'inhibiteur d'USP7 le plus spécifique, mais cible tout de même à la fois USP7 et USP47, respectivement au IC₅₀ 8,2 µM et 8,7 µM (Altun et al., 2011 - Weinstock et al., 2012). De manière intéressante, les inhibiteurs P5091 et P22077 ont été étudiés par Lee et ses collaborateurs, qui ont mis en évidence que la voie p53 n'est pas indispensable dans l'induction de l'apoptose en réponse à ces inhibiteurs, mais que cette apoptose serait causée par une augmentation du stress oxydatif et du stress du réticulum endoplasmique (Lee et al., 2016).

Par ailleurs, une étude de screening présentée précédemment sur l'activité des DUB et la spécificité de leurs inhibiteurs, a montré que le P22077 était bien plus spécifique que l'ancienne molécule HBX 41,108 (Figure 43) (Ritorto et al., 2014), mais qu'en plus d'être décrit pour cibler USP47, le P22077 se révèle comme impactant également l'activité déubiquitylase de l'USP10 (Figure 43) (Weinstock et al., 2012 - Ritorto et al., 2014).

Figure 43 : Profil d'inhibition d'USP7 par le P22077 et le HBX41. Les inhibiteurs d'USP7 (à deux concentrations différentes) ont été incubés avec un panel de 32 DUB, puis le substrat spécifique d'USP7 (p53) a été ajouté. Les taux d'inhibition sont représentés par une gamme de couleur allant du blanc (0% d'activité) à rouge foncé (100% d'activité) (Adaptée de Ritorto et al., 2014)



Depuis, plusieurs composés ont été trouvés par des compagnies pharmaceutiques comme inhibant USP7, notamment à de très faibles doses, et quelques produits naturels ont été reconnus comme inhibant USP7, notamment la Spongiacidin C, dérivée de l'éponge marine *Stylissa*, retrouvée comme inhibant USP7 avec un IC₅₀ de 3,8 µM. Ces différents composés sont décrits dans la revue de Zhou et ses collaborateurs (Zhou et al., 2018), mais leur mode d'action et leur efficacité nécessitent d'être plus étudiés.

L'ensemble de ces études sur le développement de petites molécules inhibitrices d'USP7 plus spécifiques et moins toxiques, mettent en évidence un réel espoir quant au rôle d'USP7 comme nouvelle cible thérapeutique.

Aujourd'hui, le P22077 est l'inhibiteur d'USP7 le plus étudié et le plus utilisé, et a notamment été décrit comme permettant l'induction de l'apoptose dans les cellules de neuroblastome, inhibant significativement la croissance des xénogreffes (Fan et al., 2013). Malheureusement cet inhibiteur reste encore peu soluble (63 mg/mL dans le DMSO, <1mg/mL dans l'eau ; données du fournisseur Selleckchem).

Malgré le développement de ces nombreuses molécules, et des études encourageantes quant à l'impact de leurs utilisations dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, aucune de ces molécules n'est testée dans des essais clinique pour l'heure. (données disponibles en ligne en suivant le lien) <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=USP7&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search>

En dehors de l'efficacité, la sécurité est la principale préoccupation pour l'utilisation de molécules en thérapie. Dans le cas d'USP7, sa déplétion entraîne une mortalité embryonnaire chez la souris, indiquant un rôle primordiale d'USP7 pour le développement embryonnaire murin (Kon et al., 2010). De plus, USP7 a des rôles essentiels dans la réplication de l'ADN, le cycle cellulaire, et de nombreuses autres fonctions décrites précédemment, nécessaires pour l'homéostasie cellulaire. Des inquiétudes quant aux risques de toxicité liée à l'inhibition de cette protéine sont donc compréhensibles. Pourtant, les études *in vivo* réalisées par Fan et ses collaborateurs sont encourageantes, en montrant qu'un traitement des souris au P22077 à 15 mg/kg/jour pendant 3 semaines ou à 20 mg/kg/jour pendant 12 jours n'induit pas de perte poids ni de problème de santé majeur chez ces rongeurs (Fan et al., 2013). Ces travaux *in vivo* ont bien entendu plusieurs limites et l'étude des inhibiteurs d'USP7 nécessite d'être poursuivie, mais ces recherches suggèrent que l'inhibition d'USP7 reste relativement sûre dans ce modèle.

III. USP7 et tumeurs hématopoïétiques

USP7 a émergé petit à petit comme une protéine d'intérêt dans plusieurs types de cancers solides (Becker et al., 2008 – Masuya et al., 2006 – Zhao et al., 2015 – Cheng et al., 2013b – Fan et al., 2013 – Tavana et al., 2016b – Cai et al., 2014 – Zhang et al., 2016), et récemment, des études mettent en évidence l'implication d'USP7 dans différents **cancers hématopoïétiques**, dépendamment ou indépendamment de p53.

1. Mutations d'USP7 dans les LAL T

Dans les leucémies, des mutations d'USP7 ont été retrouvées exclusivement dans des Leucémies Aiguës Lymphoblastique T (LAL T), et sont toutes dues à des modifications du cadre de lecture ou à des modification faux-sens.

Dans une première étude réalisée chez des patients atteints de cancers pédiatriques, 9 mutations d'USP7 ont été détectées. Parmi ces mutations, 5 d'entre elles seraient causées par un changement de cadre de lecture (T177fs, V203fs, R340fs, D380fs, D483fs) codant pour des protéines tronquées qui ne possèdent pas le domaine catalytique complet, et quatre mutations faux-sens (D305G, A381T, C300R, Q821R). Trois des mutations faux-sens surviennent dans le domaine catalytique, altérant la liaison à l'ubiquitine (Figure 44) (Huether et al., 2014). Pour évaluer directement les conséquences fonctionnelles des mutations d'USP7 identifiées, les formes mutantes (C300R et D305G) ou sauvages d'USP7 ont été surexprimées dans les cellules 293T, et leurs effets ont été déterminés en suivant le niveau de la mono-ubiquitilation de H2B-K120, une cible connue d'USP7. Comme attendu, la surexpression de la forme sauvage d'USP7 conduit à une réduction significative de la mono-ubiquitilation de H2B-K120, alors que l'expression des mutants d'USP7 ne modifie pas ce niveau de mono-ubiquitylation. Ces mutations semblent donc impacter l'activité déubiquitylase d'USP7. Toutes les mutations d'USP7 sauf une (A381T), ont été retrouvés chez les patients atteints de LAL T (Huether et al., 2014).

Plus tard, une autre étude portant sur les LAL T pédiatriques a identifié deux nouvelles mutations d'USP7 : un changement de cadre de lecture K238fs, et une mutation faux-sens S237A, toutes les deux présentes dans le domaine catalytique d'USP7 (Figure 44). De manière intéressante, les auteurs déterminent que les patients présentant les mutations conjointement pour USP7, TP53 et MSH6, ont un risque de rechute de leur leucémie très importante (Richter-Pechanska et al., 2017).

Enfin très récemment, une mutation somatique d'USP7 perte de fonction est retrouvée dans environ 12% des LAL T pédiatriques ou des jeunes adultes, et pourrait promouvoir la leucémogénèse (Qian et al., 2019).

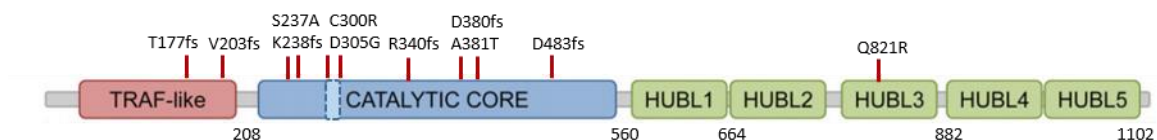


Figure 44 : Représentation schématique des mutations décrites d’USP7. Des mutations d’USP7 ont été retrouvées dans des Leucémies Aiguës Lymphoblastique T (LAL T), et sont toutes dues à des modifications du cadre de lecture ou à des modification faux-sens.

La grande majorité des mutations décrites induisent des formes tronquées de la protéine USP7, notamment dans son domaine catalytique, suggérant qu’une perte de fonction d’USP7 pourrait contribuer à la leucémogénèse. Pourtant, dans de nombreux autres modèles hématopoïétique, USP7 est retrouvée surexprimée et corrélée à un mauvais pronostique.

2. Expression d’USP7 dans les tumeurs hématopoïétiques

Des premières études réalisées dans le **Myélome Multiple** par Chauhan et ses collaborateurs, ont montré que les patients avec des niveaux élevés d’USP7 présentaient un mauvais taux de survie global, comparativement aux patients ayant un niveau d’USP7 inférieur. De plus, l’inhibition pharmacologique d’USP7 induit l’apoptose de ces cellules résistantes aux thérapies conventionnelles telles que le bortézomib, mettant en évidence un possible intérêt de cibler USP7 chez ces patients résistants (Chauhan et al., 2012).

Deux études réalisées dans les cellules de **Leucémies Lymphoïdes Chroniques** montrent respectivement que USP7 est retrouvée surexprimée et que l’inhibition d’USP7 induit un stress génotoxique et des dommages à l’ADN (Agathangelou et al., 2017), et permet d’arrêter la prolifération cellulaire et d’induire l’apoptose des cellules par le biais de la relocalisation nucléaire de PTEN, indépendamment de p53 (Carra et al., 2017).

Deux autres études parlent du rôle d’USP7 dans les **Leucémies Aiguës Lymphoïdes T (LAL T)**, où USP7 interagit avec NOTCH1 et contrôle la prolifération des cellules leucémiques, puisque l’invalidation ou l’inhibition d’USP7 (P22077) induit une diminution de la prolifération de ces cellules et leur mort *in vitro* et *in vivo*. De plus, USP7 est retrouvée surexprimée dans des échantillons primaires de patients atteints de LAL T (Jin et al., 2019 - Shan et al., 2018).

Dans le cas des **Leucémies Aiguës Promyélocitaires**, une étude utilisant le Trisenox (arsenic trioxide), utilisé pour le traitement de ces leucémies, a montré que le complexe MDM2-DAXX-USP7 était perturbé suite à ce traitement. En effet, le Trisenox induisant du stress, les voies de signalisation ATR-CHK1 et ATM-CHK2 sont activées, induisant la dissociation du complexe MDM2-DAXX-USP7, la dégradation de MDM2 et une stabilisation de p53. Les cellules vont alors subir un arrêt du cycle cellulaire et une augmentation de l’apoptose (Kumar et al., 2018).

Ces différentes études montrent l'importance d'USP7 dans plusieurs modèles leucémiques, en interagissant avec différents partenaires. Ces études placent USP7 comme une cible thérapeutique envisageable dans ces modèles pour contrecarrer la leucémogénèse.

Dans mon équipe de thèse, nous nous intéressons particulièrement aux **Leucémies Aiguës Myéloïdes**, et seul un article parle d'USP7 dans les LAM. Dans cette étude sur les LAM mutées pour NPM1, les auteurs montrent une nouvelle interaction moléculaire entre NPM1 et USP7, contrôlant le trafic et la débiquitylation de PTEN (Noguera et al., 2013). Mais dans ce travail, les auteurs ne mentionnent pas le niveau d'USP7, ou l'intérêt thérapeutique ou pronostic de ce résultat.

Comme présenté précédemment, le développement de traitements efficaces dans les LAM reste un challenge, et il est indispensable de continuer à étudier la biologie de ce cancer pour améliorer le traitement des patients pour lesquels la chimiothérapie conventionnelle n'apporte que peu de bénéfices. Au vu du rôle d'USP7 dans de nombreux cancers et notamment dans les modèles hématopoïétiques, l'étude d'USP7 dans le contexte des LAM semble intéressante. Cette question fera l'objet de mon premier axe d'étude de thèse.

Résultats

Partie 1 : USP7, nouveau régulateur de CHK1 dans les LAM, et acteur de la chimiorésistance

I. Contexte scientifique

Les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) sont un groupe d'hémopathies malignes dont l'origine vient de la transformation et de l'expansion clonale de progéniteurs myéloïdes malins. Ces cellules sont bloquées dans leur différenciation, mais possèdent un potentiel de prolifération exacerbé, induisant l'accumulation de ces cellules appelées blastes, dans la moelle osseuse et dans le sang, au détriment de l'hématopoïèse normale. Malgré l'efficacité de la chimiothérapie conventionnelle dans l'éradication des blastes leucémiques et le développement de nouveaux traitements, les rechutes restent encore trop fréquentes et des sous-groupes de patients restent résistants à ces traitements, reflétant l'existence d'une population de cellules résistantes pouvant initier la rechute. L'efficacité du traitement des LAM reste donc un challenge, et par conséquent, la découverte et la compréhension des mécanismes de résistance, ainsi que l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques sont absolument nécessaires.

C'est dans cette optique qu'une étude fluidigm a été effectuée en collaboration avec l'équipe dirigée par Jean-Sébastien Hoffman au Centre de Recherche de Cancérologie de Toulouse, afin d'évaluer l'impact pronostique de 72 gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, la stabilisation des fourches et les points de contrôle de phase S. L'analyse de cette étude menée sur une cohorte de 198 échantillons de patients atteints de LAM a permis de mettre en évidence que l'expression de *CHEK1* est un marqueur pronostic indépendant dans les LAM. En effet, un niveau de *CHEK1* supérieur à la médiane d'expression dans les cellules leucémiques, est associé à un risque accru de rechute et un faible taux de survie dans une cohorte de patients atteints de LAM ayant reçu un traitement conventionnel de chimiothérapie (anthracycline et cytarabine). De plus, nous avons mis en évidence que la résistance à la cytarabine des cellules d'échantillons de patients atteints de LAM corrèle avec une augmentation du niveau protéique de CHK1. De manière intéressante, l'inhibition de CHK1 dans ces cellules exprimant fortement CHK1, restaure la sensibilité à la cytarabine (David et al., 2016). Ces résultats suggèrent qu'une sous-population de cellules de LAM, présentant des niveaux élevés de CHK1, peuvent survivre au traitement à la cytarabine, protégées des dommages de l'ADN, et permettant le maintien d'une population cellulaire résiduelle à l'origine de la rechute. Dans ce sens, des inhibiteurs de CHK1 sont en essais cliniques en combinaison avec de la cytarabine dans les LAM, mais semblent présenter quelques toxicités (neutropénies, gastrites) (Clinical Trial).

Bien que l'hétérogénéité du niveau de CHK1 dans des échantillons primaires de LAM ait été clairement documentée dans cette publication (David et al., 2016), les mécanismes par lesquels le niveau de la protéine CHK1 est contrôlé dans ces cellules leucémiques restent à définir. Par conséquent, une

meilleure compréhension des voies moléculaires régulant les niveaux de CHK1 est nécessaire pour permettre d'appréhender la biologie des LAM et définir de nouvelles pistes thérapeutiques pour cibler CHK1 dans ces pathologies.

Plusieurs régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles de CHK1 ont été décrites, dont des mécanismes régulant sa stabilité *via* la voie ubiquitine-déubiquitine. Les ubiquitines ligases impliquées dans l'ubiquitylation et la dégradation de CHK1 au cours du cycle cellulaire ou en réponse aux dommages à l'ADN comprennent les complexes CUL4-DDB1-CDT2 et CUL1-SKP1-Fbx6 (Leung-Pineda et al., 2009 – Zhang et al., 2009), et inversement, la stabilisation de CHK1 se révèle dépendante des déubiquitylases USP1 (Guervilly et al., 2011), USP7 (Alonso de Vega et al., 2014), et très récemment décrit pour USP37 (Singh et al., 2019).

Les déubiquitylases (DUB) ont justement récemment émergé comme de nouvelles cibles anti-cancéreuses d'intérêt dans plusieurs cancers, de par leurs fonctions permettant de moduler le destin de protéines oncogéniques ou suppresseurs de tumeurs de manière spécifique, pouvant promouvoir la carcinogenèse ou la progression tumorale. Parmi ces DUB, l'Ubiquitin Specific Protease USP7 a attiré une attention particulière, de par ses rôles primordiaux directs ou indirects dans la régulation de nombreux processus cellulaires, impliqués dans l'homéostasie ou dans les cancers, *via* la régulation d'un large panel de substrats (Basu et al., 2017 – Bhattacharya et al., 2018). USP7 a donc émergé comme une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt, et de récents efforts ont mis l'accent sur la découverte et le développement de molécules inhibitrices de cette protéine. L'utilisation de ces inhibiteurs a permis d'induire l'apoptose dans les Leucémies Lymphoïdes Chroniques (Carra et al., 2017) ainsi que dans le Myélome Multiple (Chauhan et al., 2012), et de réduire la croissance de neuroblastomes *in vivo* (Fan et al., 2013).

Avec l'ensemble de ces données de la littérature, nous nous sommes demandés si USP7 pouvait être un régulateur de la stabilité de CHK1 dans les LAM, pouvant expliquer le fort niveau d'expression de CHK1 chez certains patients atteints de LAM. Ce travail a constitué le premier axe de mon travail de thèse et a permis la rédaction d'un manuscrit intitulé « Inhibition of ubiquitin-specific protease 7 sensitizes Acute Myeloid Leukemia to chemotherapy », qui est soumis au journal *Leukemia*. Ce manuscrit est disponible en Annexe 1.

II. Matériels et méthodes

1. Modèle cellulaire

Les lignées leucémiques humaines HL-60, HEL, OCI-AML3, Molm14, MV4-11 et U937 ont été utilisées pour l'étude.

Les échantillons primaires de patients atteints de LAM ont été obtenus auprès du Centre de Ressources Biologiques au Centre de Recherche de Cancérologie de Toulouse, au sein de la tumorotheque HIMIP (BB-0033-00060). En accord avec le droit Français, la collection HIMIP a été déclarée au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (collection1 DC 2008-307) et obtenue par l'accord de transfert (AC 2008-129) après approbation par les comités d'éthique (Comité de Protection des Personnes sud-ouest et Outremer II et le Comité d'éthique de l'APHP). Les annotations des échantillons cliniques et biologiques ont été déclarées à la CNIL (Comité National Informatique et Libertés).

2. Mesure du potentiel clonogénique des cellules primaires de patients atteints de LAM

Pour évaluer la répercussion fonctionnelle de l'exposition des cellules primaires aux traitements utilisés, ces cellules ont étéensemencées dans un milieu semi-solide à base de méthylcellulose supplémenté par des cytokines sécrétées par les cellules 5637 (lignée cellulaire du cancer de la vessie). Après 7 jours de culture, le potentiel clonogénique des cellules, c'est-à-dire la capacité des cellules à former des clones, est mesuré par comptage des colonies formées définies par un groupe d'au moins 5 cellules.

3. Xénogreffes de souris NOD SCID gamma (NSG)

Les souris NOD/LtSz-SCID/ IL-2R γ chain null (NSG) provenant de chez Charles River ont été élevées à l'UMS006 à Toulouse (France). Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le Comité d'Ethique UMS006 et la région Midi-Pyrénées (agrément 2017071314596526). Les souris âgées de 6 à 9 semaines, ont été traitées au busulfan (30 mg/kg) 24 h avant l'injection de 2.10^6 cellules leucémiques OCI-AML3 dans la veine de la queue des souris. Vingt-deux jours après l'injection, les souris ont été réparties aléatoirement en groupes et ont été traités par des injections intra-péritonéales quotidiennes de l'inhibiteur d'USP7 (P22077 ; 30 mg/kg).

Pour la greffe de cellules leucémiques dérivées de patients (Patient Derived Xenograft PDX), les souris âgées de 6 à 9 semaines, ont été traitées au busulfan (30 mg/kg) 24 h avant l'injection de 3.10^6 cellules primaires d'un patient atteint de LAM. Vingt-deux semaines après l'injection, le sang périphérique des souris a été récupéré pour déterminer la fraction de blastes humains présents *via* une analyse par cytométrie de flux, afin de déterminer le niveau de prise de greffe. Lorsque la prise de greffe a été confirmée (plus de 20 blasts/ μ L de sang), les souris ont été traitées par injections intrapéritonéales de l'inhibiteur d'USP7 (P22077 ; 15 mg/kg), 3 jours par semaine pendant 2 semaines et tous les jours pendant 1 semaine. Après sacrifice des souris, la moelle osseuse (récupérée des tibias et des fémurs) ainsi que la rate ont été disséquées. L'envahissement de la moelle osseuse et la rate (prise de greffe) a

été déterminé par identification de la fraction de blastes humains présents (hCD45+ mCD45.1–hCD33+) par analyse en cytométrie de flux.

Une surveillance quotidienne des souris a systématiquement été effectuée pour identifier les symptômes de la maladie (faiblesse, mobilité réduite, perte de poils et de poids) afin de sacrifier les animaux présentant des signes de détresse. Les souris NSG ont été sacrifiées conformément aux protocoles d'éthique européens.

4. Analyse par Single-cell

La technique d'analyse par cellule unique, « Single cell », permet de quantifier les transcrits de chacune des cellules se trouvant dans la population hétérogène d'un échantillon.

Brièvement, ici les cellules du sang d'un patient atteint de LAM ont été prélevées au moment du diagnostic et lors de la rechute après traitement chimiothérapeutique. Les cellules primaires ont été purifiées par centrifugation sur gradient de Ficoll et les blastes leucémiques ont été triés selon l'expression CD45 +, CD33 + et ANNEXIN-. Cinq cent cellules ont été utilisées pour chaque condition de l'analyse par cellule unique *via* la technique de 10xGenomics (Figure 45), en suivant les recommandations de la compagnie. Grâce à cette technique, chaque cellule est isolée dans une gouttelette d'huile contenant des réactifs (polymérase, oligonucléotide, retrotranscriptase...) et une bille particulière appelée GEM (Gel bead in EMulsion). Chaque GEM est recouverte de séquences adaptatrices uniques contenant un code barre, un UMI (Unique Molecular Identifiers) et la séquence PolyT (Figure 45).

- Le code barre est l'identifiant unique de la bille, et donc unique à la cellule.
- L'UMI est une courte séquence aléatoire unique à chaque fragment, utilisée pour éviter les biais d'amplification. Plusieurs UMI sont présents sur chaque bille, et si une séquence est trop amplifiée par erreur dans une goutte, elle sera détectée, car le même UMI sera représenté plusieurs fois.
- La séquence polyT va permettre la fixation des ARN messagers par complémentarité avec leur queue polyA.

La réaction de RNA-seq peut alors se faire. Après lyse de la cellule, les ARN messagers sont capturés à la surface de la GEM par leurs queues polyA, et sont convertis en ADN codant. Après le séquençage et l'alignement, il suffira de regrouper les données provenant d'une même cellule en comparant leurs codes barre. On peut alors représenter la matrice d'expression dans un graphique en réalisant une analyse où chaque point correspond à une cellule.

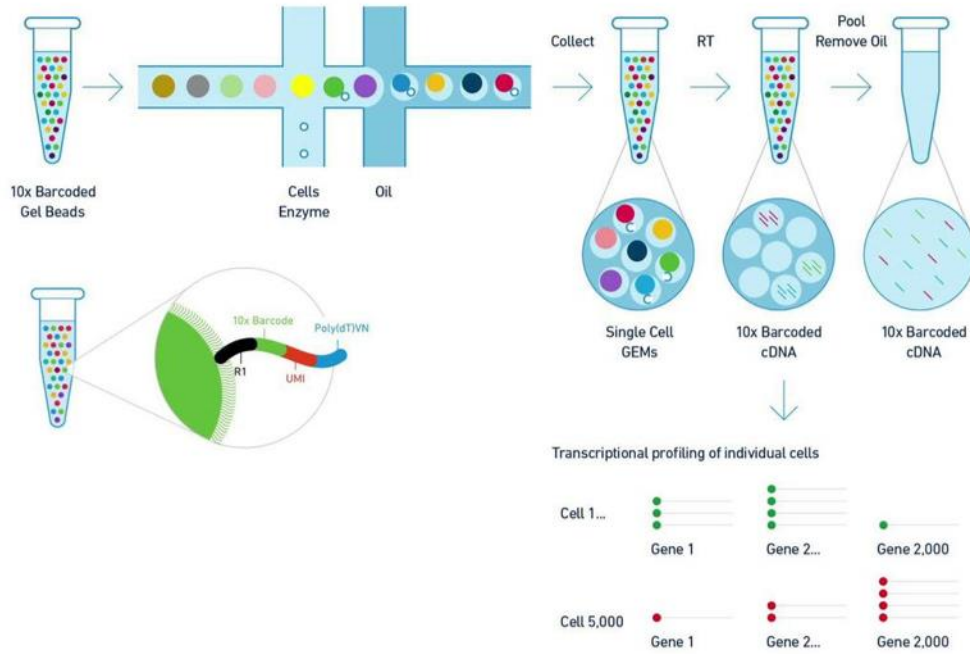
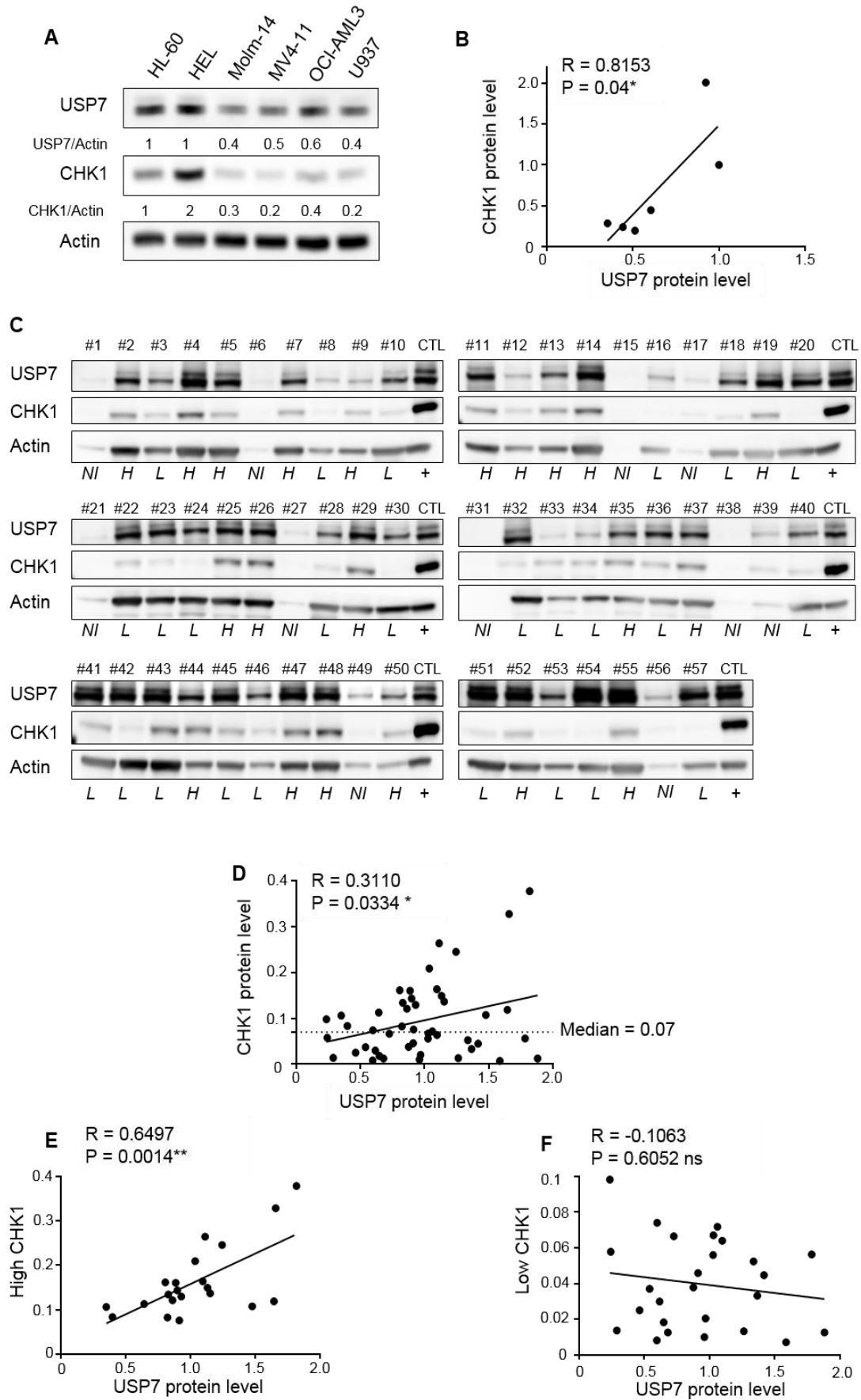


Figure 45 : Principe de la technique d'analyse de cellule unique par 10xGenomics. Chaque cellule est isolée dans une gouttelette d'huile avec une bille possédant un code barre unique (GEM). Après lyse de la cellule, les ARN messagers vont se fixer aux séquences polyT présentes sur les GEM pour être converties en ADN codant.

III. Résultats

Pour commencer cette étude, j'ai tout d'abord étudié le niveau d'expression protéique de CHK1 et de USP7 dans un panel de 6 lignées cellulaires de LAM (Figure 46A). Les deux protéines présentent une expression hétérogène entre les lignées, et leur expression se révèle significativement corrélée (Figure 46B). J'ai ensuite effectué une analyse similaire sur une cohorte de 57 échantillons primaires de patients atteints de LAM (Figure 46C). Sur les 57 échantillons primaires, 11 n'étaient pas utilisables (échantillons dégradés ou quantité d'actine insuffisante) et sont indiqués « Non Inclus » (NI) sur la figure. Comme observé dans une précédente étude (David et al., 2016), CHK1 présente une hétérogénéité d'expression entre les échantillons primaires de LAM. Grâce à la quantification du signal obtenu pour CHK1 en western blot, nous avons pu déterminer la médiane d'expression de CHK1 et ainsi discriminer les échantillons possédant un fort niveau de CHK1 (indiqué H sur la Figure 46C, pour High CHK1, comme les échantillons #29 #47 #48) et ceux possédant un faible niveau de CHK1 (indiqué L sur la Figure 46C, pour Low CHK1, comme les échantillon #28 #30 #46). De manière intéressante, USP7 se révèle également exprimée de manière très hétérogène dans ces échantillons. L'étude de la corrélation entre l'expression de ces deux protéines a révélé que CHK1 et USP7 ont une expression significativement corrélée entre les différents échantillons (Figure 46D), mais que cette corrélation est d'autant plus significative en discriminant les échantillons primaires en fonction de leur niveau de CHK1. En effet, CHK1 et USP7 ont une expression significativement corrélée dans les échantillons présentant un fort niveau de CHK1 par rapport à la médiane (Figure 46E), mais cette corrélation n'est pas retrouvée dans les échantillons primaires avec un faible niveau de CHK1 (Figure 46F), laissant envisager un rôle d'USP7 dans la régulation de CHK1 majoritairement dans les cellules ayant un fort niveau de CHK1.

Figure 46 : Les niveaux protéiques de CHK1 et USP7 sont corrélés dans les lignées cellulaires et les échantillons primaires de LAM. **A :** Analyse par western blot du niveau protéique de CHK1 et USP7 dans différentes lignées cellulaires de LAM. Le niveau protéique a été normalisé par rapport à l'actine, et la lignée HL-60 est utilisée comme contrôle interne (niveau des protéines placé à 1). **B :** Analyse de la corrélation d'expression entre CHK1 et USP7 dans les lignées leucémiques par régression linéaire. **C :** Analyse par western blot du niveau protéique de CHK1 et USP7 dans 57 échantillons primaires de patients atteints de LAM. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les échantillons sont considérés comme exprimant un fort niveau de CHK1 (H) si l'abondance de la protéine quantifiée est supérieure à la médiane d'expression. Des extraits de la lignée HL-60 ont été utilisés comme contrôle entre les gels (CTL). Certains échantillons ne sont pas inclus dans l'analyse (NI) en raison de leur qualité (dégradation, ou actine insuffisante pour quantifier). **D :** Analyse de la corrélation d'expression entre CHK1 et USP7 dans les 46 échantillons primaires utilisables, par régression linéaire. **E :** Régression linéaire de la corrélation d'expression protéique entre CHK1 et USP7, dans les 21 échantillons de patients présentant un fort niveau de CHK1 (High CHK1). **F :** Régression linéaire de la corrélation d'expression protéique entre CHK1 et USP7, dans les 25 échantillons de patients présentant un faible niveau de CHK1 (Low CHK1).



Afin de déterminer si USP7 est capable de réguler CHK1 dans les cellules de LAM, j'ai tout d'abord effectué une immunoprécipitation de CHK1 dans les lignées leucémiques HL-60 et HEL (Figure 47A et 47B respectivement), afin de déterminer si les deux protéines peuvent interagir dans un même complexe. Dans les deux lignées cellulaires, USP7 co-immunoprécipite avec CHK1 de manière spécifique. Afin de visualiser une proximité plus fine entre ces deux protéines, j'ai réalisé des expériences de Proximité de Liaison (PLA pour Proximity Ligation Assay). Cette technique permet de visualiser une proximité entre deux protéines si celles-ci sont à moins de 40 nM de distance. Par cette approche, j'ai pu confirmer que CHK1 et USP7 ont une proximité de localisation dans la lignée cellulaire HL-60, représentée par l'apparition de points rouges dans la condition contrôle (Figure 47C). L'invalidation par siARN de CHK1 ou USP7 permet de confirmer la spécificité du signal obtenu, puisque la diminution du niveau protéique d'un des deux partenaires permet de diminuer le nombre de points rouges (Figure 47C et D). Dans le but de déterminer précisément le domaine d'interaction entre ces deux protéines, j'ai utilisé différentes constructions d'USP7 permettant l'expression de protéines tronquées pour USP7 (Figure 48A). Ainsi, j'ai pu surexprimer plusieurs formes d'USP7 étiquetée FLAG, dont une forme totale d'USP7 (FL pour Full Length), une forme contenant seulement la partie N-terminale avec le domaine TRAF (USP7 NTD) décrit comme responsable de l'interaction avec les partenaires d'USP7 (Hu et al., 2006 ; Sheng et al., 2006), une forme contenant seulement le domaine catalytique (USP7 CAD), et une forme contenant les 5 domaines UBL en C-terminal (USP7 CTD), permettant normalement le maintien de la conformation active d'USP7 et l'interaction avec ses substrats (Bhattacharya et al., 2018). Les cellules leucémiques étant difficilement transfectables pour induire une surexpression, j'ai utilisé des cellules HeLa, beaucoup plus facile d'utilisation pour ce type d'expérience, dans lesquelles j'ai donc transfecté 4 µg de plasmide contenant l'ADN codant pour les formes tronquées d'USP7. 24 h après la transfection, j'ai réalisé une immunoprécipitation de CHK1 dans ces cellules pour identifier le domaine d'interaction d'USP7 avec CHK1. Comme contrôle de transfection, une condition GFP a été effectuée. Malheureusement, à chaque transfection, des niveaux très variés des protéines tronquées d'USP7 sont retrouvés en western blot (Figure 48B, fraction Input), bien que la même quantité d'ADN ai été transfectée. Ceci suggère une régulation différentielle de ces formes tronquées d'USP7, probablement au niveau de leur stabilité, mais cette question n'a pas été plus amplement étudiée dans ce travail. Malgré ces variations d'expression des formes tronquées d'USP7, après immunoprécipitation de CHK1, nous pouvons voir que chaque forme tronquée d'USP7 semble co-immunoprécipiter avec CHK1 (Figure 48B), suggérant que toutes les formes tronquées d'USP7 possèdent un domaine d'interaction avec CHK1. Cette expérience, répétée à plusieurs reprises, ne permet pas de dire avec certitude si un domaine d'USP7 interagit préférentiellement avec CHK1 au vu des variations d'expression, et cette question mériterait d'être approfondie.

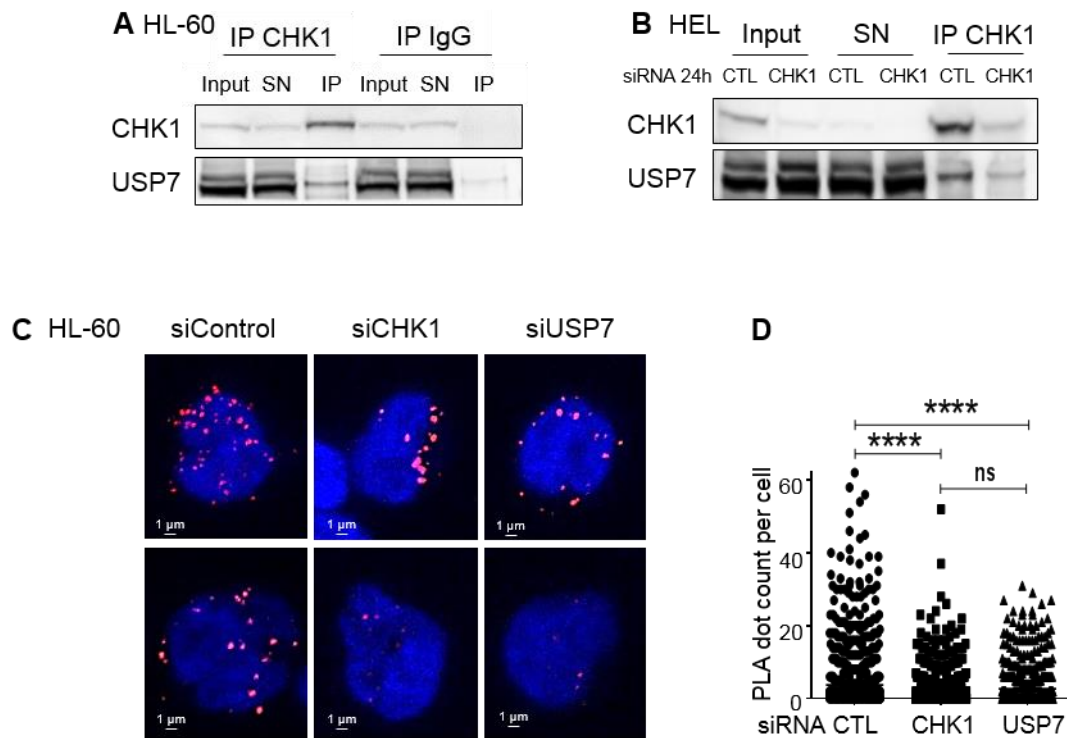
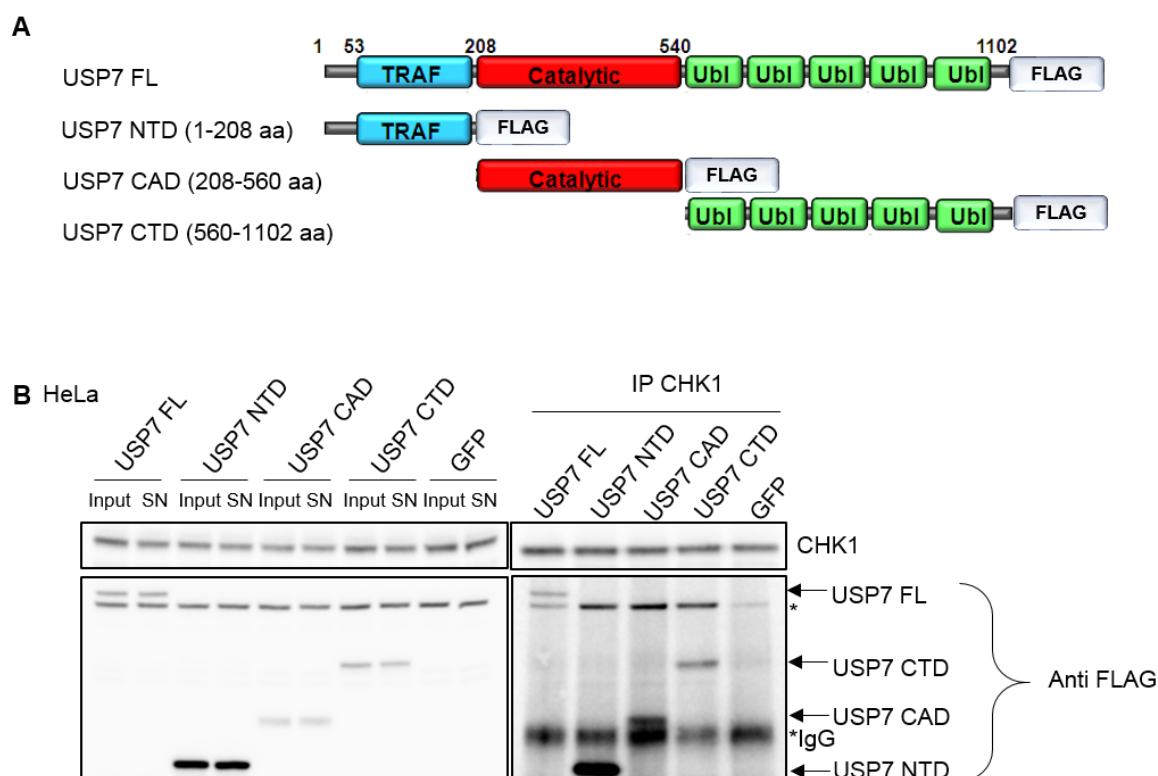


Figure 47 : USP7 et CHK1 interagissent dans les lignées cellulaires leucémiques. **A** : Western blot obtenu après immunoprécipitation de CHK1 (ou l'IgG correspondant à l'anticorps pour contrôle) dans les cellules HL-60. La fraction surnageant est indiquée par SN. **B** : Western blot obtenu après immunoprécipitation de CHK1 dans les cellules HEL. 24 h avant l'immunoprécipitation, les cellules ont été transfectées par 300 nM de siARN dirigé contre CHK1 ou un siARN contrôle (CTL). **C** : Expérience de proximité de liaison (PLA) dans les cellules HL-60 effectuée en utilisant les anticorps dirigés contre USP7 et CHK1, et l'ADN a été coloré au DAPI. 48 h avant la PLA, les cellules ont été transfectées avec les siARN indiqués. Des images Z ont été acquises puis « superposées » par microscopie confocale. **D** : La quantification des points rouges de PLA a été effectuée grâce au logiciel Zen et ImageJ. Pour la PLA contrôle, CHK1 et USP7 : moyenne=3.75+/-0.22 points/cellule avec 1180 noyaux analysés (n=4) ; pour la condition siARN CHK1 : moyenne=1.85+/-0.12 points/cellule avec 1126 noyaux analysés (n=4) ; pour la condition siARN USP7 : moyenne=2.69+/-0.21 points/cellule avec 650 noyaux analysés (n=3). Les *P*-values ont été déterminées avec le test de Mann-Whitney, *****P*≤0.0001.

Figure 48 : Etude du site d'interaction d'USP7 avec CHK1. **A** : Représentation schématique des domaines tronqués d'USP7 utilisés. **B** : Western blot obtenu après immunoprécipitation (IP) de CHK1 dans les cellules HeLa



après transfection Jet Prime des ADNc pour les formes tronquées d'USP7. Une transfection avec la GFP a été utilisée comme contrôle positif de transfection, et comme contrôle négatif de l'immunoprécipitation. La fraction surnageant est indiquée par SN.

Après avoir confirmé que CHK1 et USP7 interagissent dans les lignées leucémiques, j'ai ensuite voulu déterminer si la déubiquitylase USP7 pouvait affecter l'ubiquitylation de CHK1 dans ces cellules. Pour ce faire, j'ai effectué des tests d'ubiquitylation.

Dans un premier temps, j'ai généré des particules lentivirales pour permettre la surexpression d'ubiquitine taguée HA dans les cellules leucémiques, *via* une étape de transfection transitoire dans des cellules 293T. Une fois les particules virales obtenues, les cellules HL-60 ont subi une spinoculation avec les lentivirus, afin de favoriser l'infection de ces cellules, incubées ensuite pendant 72 h à 37°C. Ces cellules ont ensuite été transfectées avec les siARN contrôle ou dirigés contre CHK1 et USP7 pendant 48 h. Six heures avant l'immunoprécipitation de CHK1, les cellules ont finalement été traitées avec l'inhibiteur du protéasome le MG132, afin d'accumuler les protéines ubiquitylées (Figure 49A). La protéine CHK1 endogène a été immunoprécipitée, puis le western blot a été effectué avec les anticorps dirigés contre CHK1 ou HA (Figure 49B). Le signal HA obtenu, correspondant aux ubiquitines associées à CHK1, est plus intense dans la condition où USP7 est invalidée, en comparaison aux conditions contrôles, montrant un rôle d'USP7 dans la déubiquitylation de CHK1.

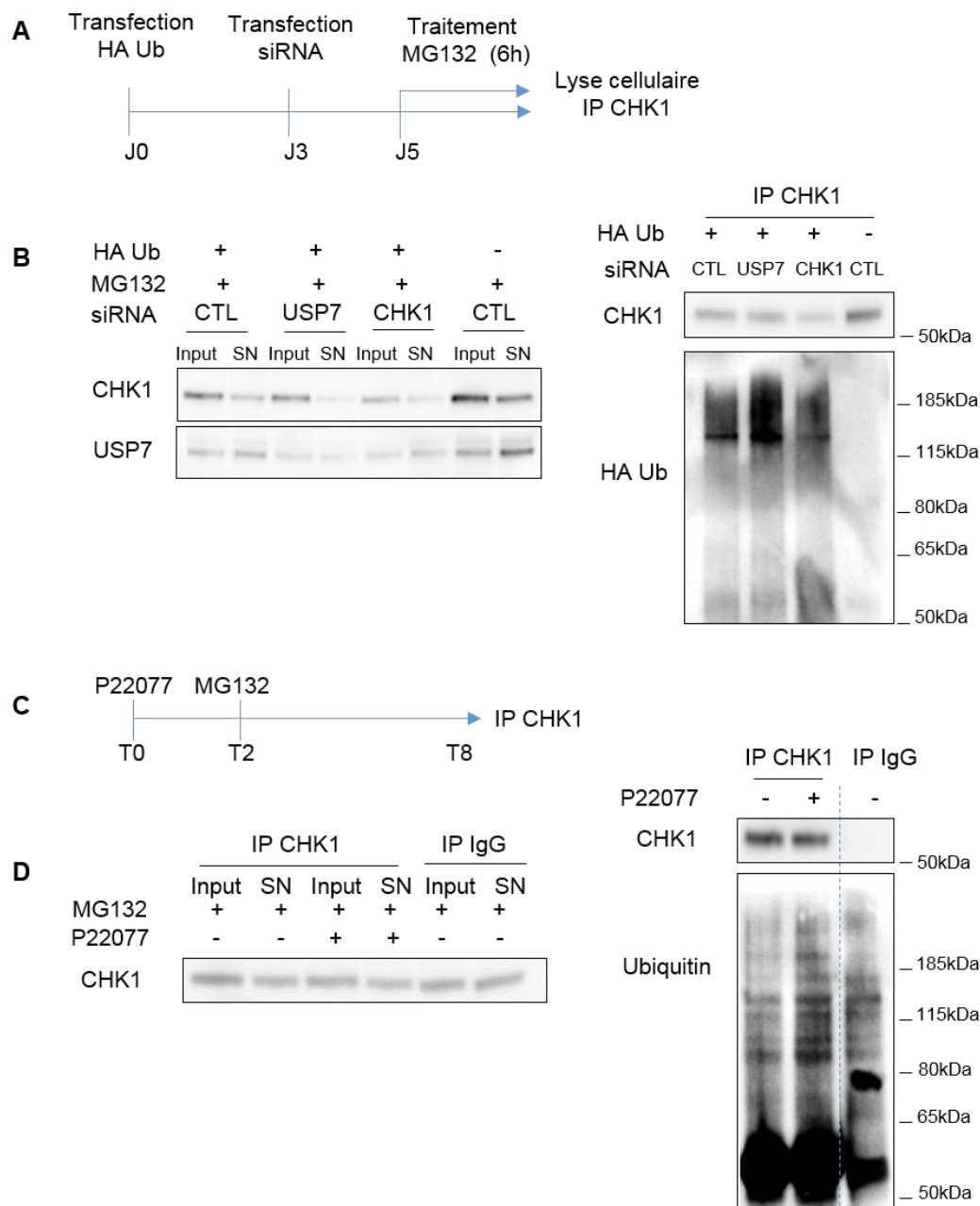


Figure 49 : USP7 déubiquityle CHK1 dans les cellules leucémiques. **A** : Représentation schématique de la chronologie de l'expérience. Un test d'ubiquitylation de CHK1 a été réalisé dans des cellules HL-60. Les cellules ont été transfectées avec de l'ubiquitine étiquetée HA pendant 72h, puis transfectées avec des siARN contrôle, ou dirigés contre CHK1 et USP7 pendant 48 h. Enfin, 6 h avant l'immunoprécipitation, les cellules ont été traitées avec 10 µg/mL de MG132. **B** : L'immunoprécipitation de CHK1 a été réalisée, suivie par une analyse par western blot avec les anticorps indiqués. **C** : Représentation schématique de la chronologie de l'expérience. Un test d'ubiquitylation de CHK1 a été effectué dans des cellules HL-60 traitées avec l'inhibiteur pharmacologique d'USP7 (10 µM de P22077) pendant 8h. Les 6 dernières heures, un traitement au MG132 (10 µg/mL) a été effectué. **D** : L'immunoprécipitation de CHK1, ou de l'immunoglobuline correspondant à l'anticorps utilisé (IgG) a été effectuée, suivie par une analyse par western blot avec les anticorps indiqués.

Afin de confirmer cette observation, une expérience similaire a été effectuée mais sans surexpression de l'ubiquitine étiquetée HA. Pour ce faire, les cellules HL-60 ont seulement été traitées pendant 8 h avec

un inhibiteur décrit pour cibler USP7, le P22077 (Altun et al., 2011 - Weinstock et al., 2012). Pendant les 6 dernières heures de traitement, l'inhibiteur du protéasome, le MG132 a été ajouté (Figure 49C), puis CHK1 a été immunoprécipitée (Figure 49D). De manière similaire à l'expérience précédente, le signal d'ubiquitine associé à CHK1 immunoprécipitée est plus intense dans la condition où USP7 est inhibé par le P22077, en comparaison avec la condition contrôle. Ces résultats montrent que USP7 est bien un régulateur de l'ubiquitylation de CHK1 dans les cellules leucémiques.

Au vu des études montrant que le P22077, l'inhibiteur d'USP7 utilisé lors de notre étude, cible également les USP47 et USP10 (Weinstock et al., 2012 - Ritorto et al., 2014), la question du niveau d'expression de ces deux autres USP dans nos modèles s'est donc posée. Grâce à l'utilisation des données publiques sur le site Human Protein Atlas (en ligne <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000187555-USP7/cell> [page consultée le 28/03/2019]), nous pouvons voir que la quantité de transcrits d'USP47 et d'USP10 est bien moins importante que la quantité d'USP7 dans nos deux modèles cellulaires HL-60 et HEL (Figure 50), suggérant un rôle plus important d'USP7 dans ces cellules, et nous permettant donc d'utiliser cet inhibiteur dans nos modèles pour la poursuite de notre étude.

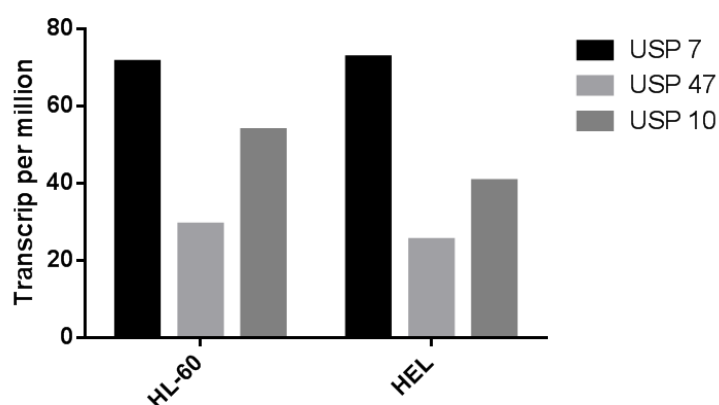


Figure 50 : Niveau de transcrit par million des Ubiquitine Specific Proteases 7, 10 et 47 dans les lignées leucémiques HL-60 et HEL. Données de RNA-seq obtenues dans différentes lignées cellulaires. Adapté de Human Protein Atlas – en ligne, page consultée le 28/03/2019.

Il est maintenant donc certain que USP7 interagit avec CHK1 dans les lignées cellulaires de LAM et que cette interaction permet à USP7 de réguler la déubiquitylation de CHK1. Grâce aux données de la littérature, nous savons que la déubiquitylation des protéines par USP7 peut induire une stabilisation (Li et al., 2002) et/ou une modification de la localisation sub-cellulaire de la protéine cible (Song et al., 2008). La question de l'impact de la régulation d'USP7 sur CHK1 s'est donc posée.

Dans un premier temps, j'ai voulu évaluer l'impact de l'inhibition d'USP7 par le P22077 sur la stabilité de CHK1 dans la lignée leucémique HL-60. Un traitement au P22077 induit une diminution significative

du niveau protéique de CHK1 visible à partir de 8h jusqu'à 24 h de traitement (Figure 51A). J'ai effectué mes premières études sur la lignée HL-60 car cette lignée n'exprime pas la protéine p53, un substrat majeur d'USP7. Ainsi, en utilisant cette lignée cellulaire j'évitais tout effet causé par une régulation de p53. Pour déterminer si p53 jouait en effet un rôle dans cette modification du niveau de CHK1, j'ai reproduit ces résultats dans les lignées OCI-AML3 et HEL qui expriment toutes deux la protéine p53 à des niveaux différents (Figure 51B), et qui expriment également un fort niveau de CHK1 et USP7 (Figure 46A). Comme montré dans la figure 51, l'inhibition d'USP7 par le P22077 induit une diminution de CHK1 de manière similaire à celle obtenue dans la lignée HL-60 (Figure 51C), ainsi qu'une diminution de CHK1 dans les cellules HEL où aucun impact sur le niveau de p53 n'est observé (Figure 51D). De plus, l'utilisation de deux séquences différentes de siARN dirigées contre USP7 dans les HL-60 et HEL pendant 48 h, montrent une perte d'environ 30% de CHK1 dans toutes les conditions, bien que l'inactivation d'USP7 ne soit pas totale (Figure 51E et F). L'ensemble de ces résultats montrent qu'une inhibition pharmacologique ou une inactivation d'USP7 par siARN dans 3 lignées leucémiques différentes, induit une diminution du niveau protéique de CHK1, indépendamment de p53, révélant un rôle de l'activité déubiquitylase d'USP7 sur la stabilité de CHK1.

Afin de déterminer si USP7 peut également réguler la localisation subcellulaire de CHK1, ou si USP7 cible CHK1 dans un compartiment particulier, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées. Les cellules HL-60 ont été traitées pendant 16 h au P22077 puis une immunofluorescence en utilisant un anticorps dirigé contre CHK1 a été effectuée. Par cette approche, l'impact de l'inhibition d'USP7 sur le niveau protéique de CHK1 est confirmé puisque, comme lors de l'étude par western blot sur cette lignée, 50% du CHK1 total est perdu (Figure 52). L'analyse a été réalisée grâce à l'utilisation d'une macro développée sur ImageJ, afin d'évaluer l'impact sur la localisation de CHK1. Bien que l'inhibition d'USP7 induise une diminution du niveau de CHK1 légèrement plus importante au niveau nucléaire, cette différence ne révèle pas une réelle relocalisation de CHK1 dans ce contexte, et induit une diminution de CHK1 aussi bien nucléaire que cytoplasmique (Figure 52).

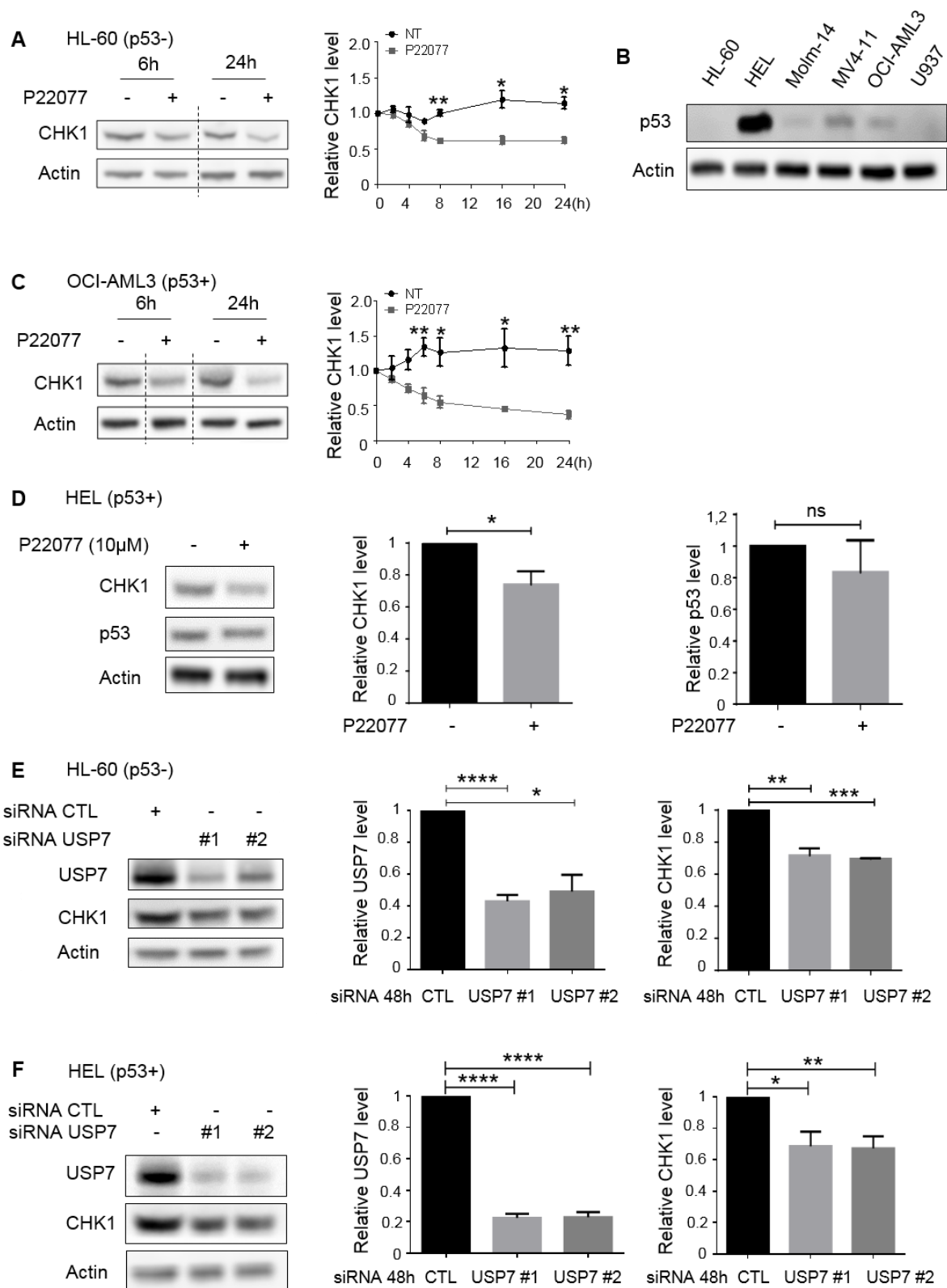


Figure 51 : USP7 régule le niveau protéique de CHK1 dans les lignées cellulaires de LAM. **A** : Les cellules HL-60 ont été traitées avec l'inhibiteur d'USP7 P22077 à 10 μM, et récupérées aux temps indiqués pour analyser le niveau protéique de CHK1 par western blot. Le graphique associé montre la quantification du niveau protéique

de CHK1 normalisé par rapport à l'actine puis au temps 0, obtenus à partir de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée grâce à un t-test non apparié avec correction de Welch. * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.01$. **B** : Le niveau protéique de p53 a été déterminé par western blot dans différentes lignées cellulaires de LAM. **C-D** : Les expériences réalisées sont identiques à la figure A, mais ont été effectuées sur la lignée cellulaire OCI-AML3 (C) et HEL (D). **E-F** : Les cellules HL-60 (E) ou HEL (F) ont été transfectées avec les siARN contrôle (CTL) ou dirigés contre USP7, et le niveau protéique de CHK1 et USP7 a été analysé par western blot 48 h après la transfection. Le graphique associé montre la quantification du niveau protéique de CHK1 et USP7 normalisé par rapport à l'actine et à la condition contrôle. L'analyse statistique a été effectuée grâce à un t-test non apparié avec correction de Welch. * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$. (HL-60 séquence #1 n=6 ; HL-60 séquence #2 n=3 ; HEL séquences #1 et #2 n=5).

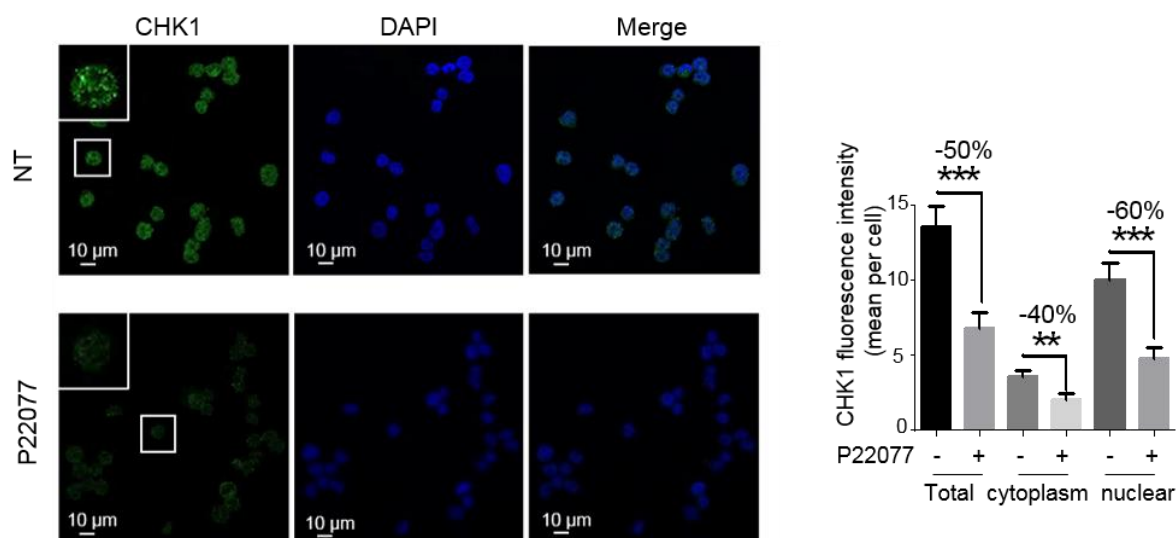


Figure 52 : L'inhibition d'USP7 impacte le niveau protéique de CHK1 cytoplasmique et nucléaire. Images obtenues au microscope confocal après avoir effectué une immunofluorescence dirigée contre CHK1 dans les cellules HL-60 traitées ou non à l'inhibiteur d'USP7 (P22077) pendant 16 h. L'ADN des cellules a été marqué au DAPI. La quantification des images a été effectuée grâce aux logiciels Zen et ImageJ pour déterminer l'intensité de fluorescence de CHK1 total, cytoplasmique et nucléaire. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont représentés dans le graphique associé. 541 noyaux ont été analysés pour la condition contrôle, et 444 noyaux ont été analysés pour la condition P22077. L'analyse statistique a été effectuée par un test de Mann-Whitney ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$.

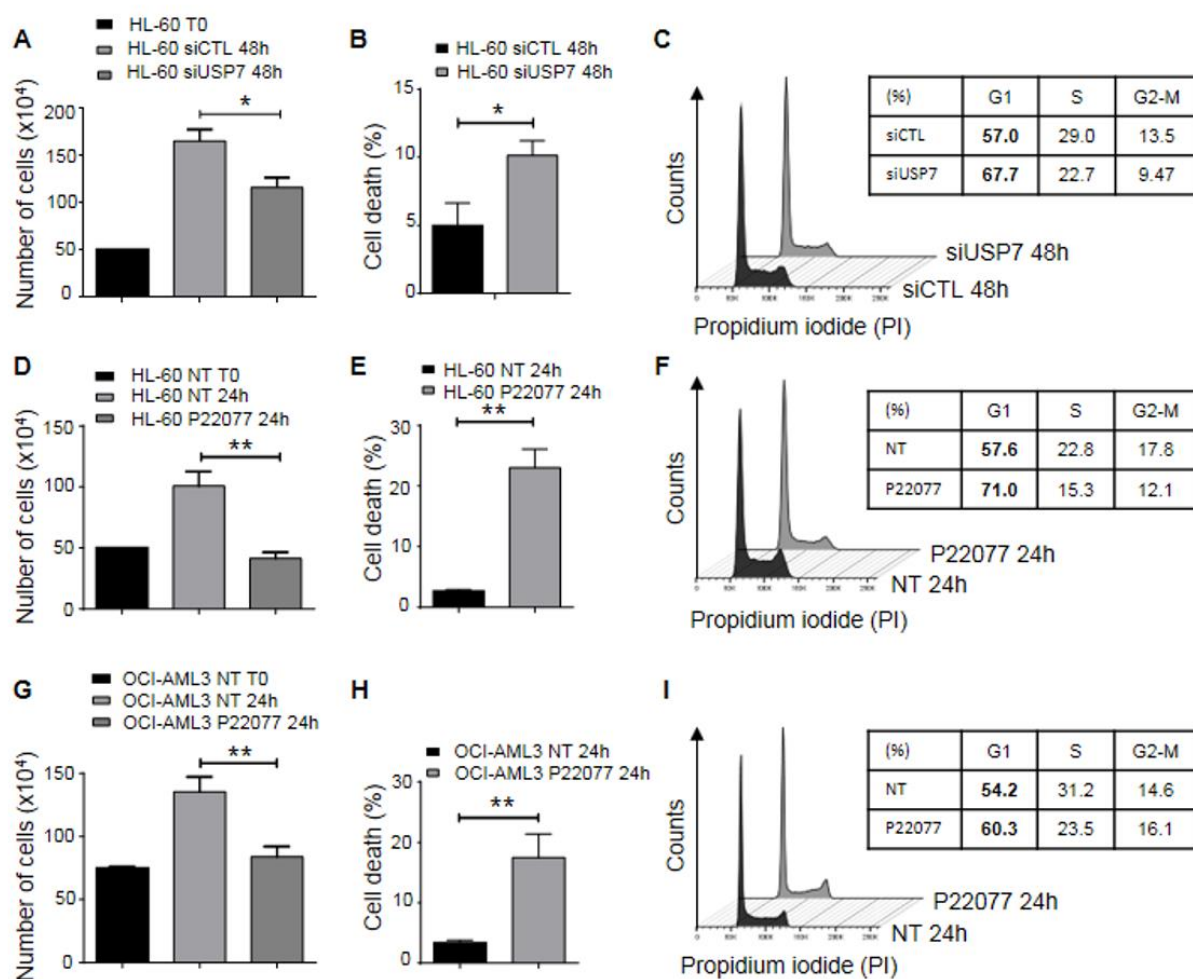


Figure 53 : L'inhibition ou l'inactivation d'USP7 induit l'apoptose et bloque le cycle des cellules de lignées leucémiques. **A** : Les cellules HL-60 ont été transfectées avec les siARN contrôle (CTL) ou dirigés contre USP7 pendant 48 h, et le nombre de cellules a été établi par comptage au Bleu de Trypan. L'analyse statistique a été effectuée grâce à un t-test non apparié avec correction de Welch. * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.01$. $n=5$. **B** : Dans des expériences identiques à celle décrite en A, la mortalité cellulaire a été suivie par cytométrie de flux *via* un marquage annexinV/cell viability, et les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo. Les données sont présentées en indiquant la moyenne \pm sem sur 4 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée grâce à un t-test non apparié. **C** : Dans des expériences identiques à celle décrite en A, la répartition dans le cycle cellulaire a été étudiée grâce à l'utilisation de l'intercalant de l'ADN, l'Iodure de Propidium (PI). Le cycle cellulaire a été suivi par cytométrie de flux et les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo. **D** : Les cellules HL-60 ont été traitées avec 10 μ M de P22077 pendant 24 h, et le nombre de cellules a été établi par comptage au Bleu de Trypan. L'analyse statistique a été effectuée comme pour l'expérience A ($n=5$). **E** : Dans des expériences identiques à celles décrites en D, la mortalité cellulaire a été suivie par cytométrie de flux *via* un marquage annexinV/cell viability, et les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo. L'analyse statistique a été effectuée comme pour l'expérience B ($n=3$). **F** : Dans des expériences identiques à celles décrites en D, la répartition dans le cycle cellulaire a été déterminée de manière similaire à l'expérience B. **G – I** : Les expériences ont été réalisées à l'identique des expériences D-E-F mais sur la lignée cellulaire OCI-AML3 ($n=5$).

Après avoir déterminé que USP7 régule le niveau protéique de CHK1 *via* son activité déubiquitylase, j'ai voulu déterminer si l'invalidation ou l'inhibition d'USP7, en diminuant le niveau protéique de CHK1, pouvait impacter le cycle cellulaire, la viabilité ou la différenciation des cellules leucémiques.

Comme montré dans la figure 53, l'invalidation d'USP7 par siARN dans la lignée HL-60 induit une diminution de la prolifération des cellules, due à une augmentation de l'apoptose de ces cellules et à un blocage du cycle cellulaire en phase G1 (Figure 53A-C). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant l'inhibiteur pharmacologique d'USP7 (P22077) pendant 24 h, à la fois dans la lignée cellulaire HL-60 (Figure 53D-F) et dans la lignée OCI-AML3 (Figure 53G-I), montrant un effet indépendant du statut p53 dans les lignées leucémiques. Les cellules leucémiques étant bloquées dans leur différenciation, il est intéressant de voir si un traitement est capable, en plus de tuer les cellules leucémiques, d'induire la différenciation des cellules résiduelles. De plus, l'inhibition d'USP7 a été rapportée dans le cancer colorectal comme favorisant la différenciation normale des cellules (Novellademunt et al., 2017). J'ai donc étudié l'impact de l'inhibition d'USP7 sur la capacité de différenciation des cellules leucémiques HL-60 et HEL. Les cellules HL-60 sont en effet capables de se différencier dans la voie monocyte-granulocyte de manière spontanée ou sous stimulation au PMA (Phorbol Myristic Acetate), et cette différenciation peut être suivie grâce au cluster de différenciation CD11B. Les cellules HEL quant à elles sont capables de se différencier de manière spontanée et sous stimulation au PMA dans la voie érythrocyte-mégacaryocyte, et cette différenciation peut être suivie par le cluster de différenciation CD61 (ou GPIIIa). Après stimulation au PMA pendant 3 et 7 jours, les cellules HL-60 et HEL sont en effet capables de se différencier, mais un traitement avec l'inhibiteur d'USP7 (P22077) ne semble pas stimuler la différenciation, en comparaison aux conditions stimulées au PMA (Figure 54 A et B).

L'inhibition d'USP7 par le P22077 impacte donc la viabilité et le cycle des cellules, sans restaurer la capacité de différenciation des cellules résiduelles dans ces modèles leucémiques.

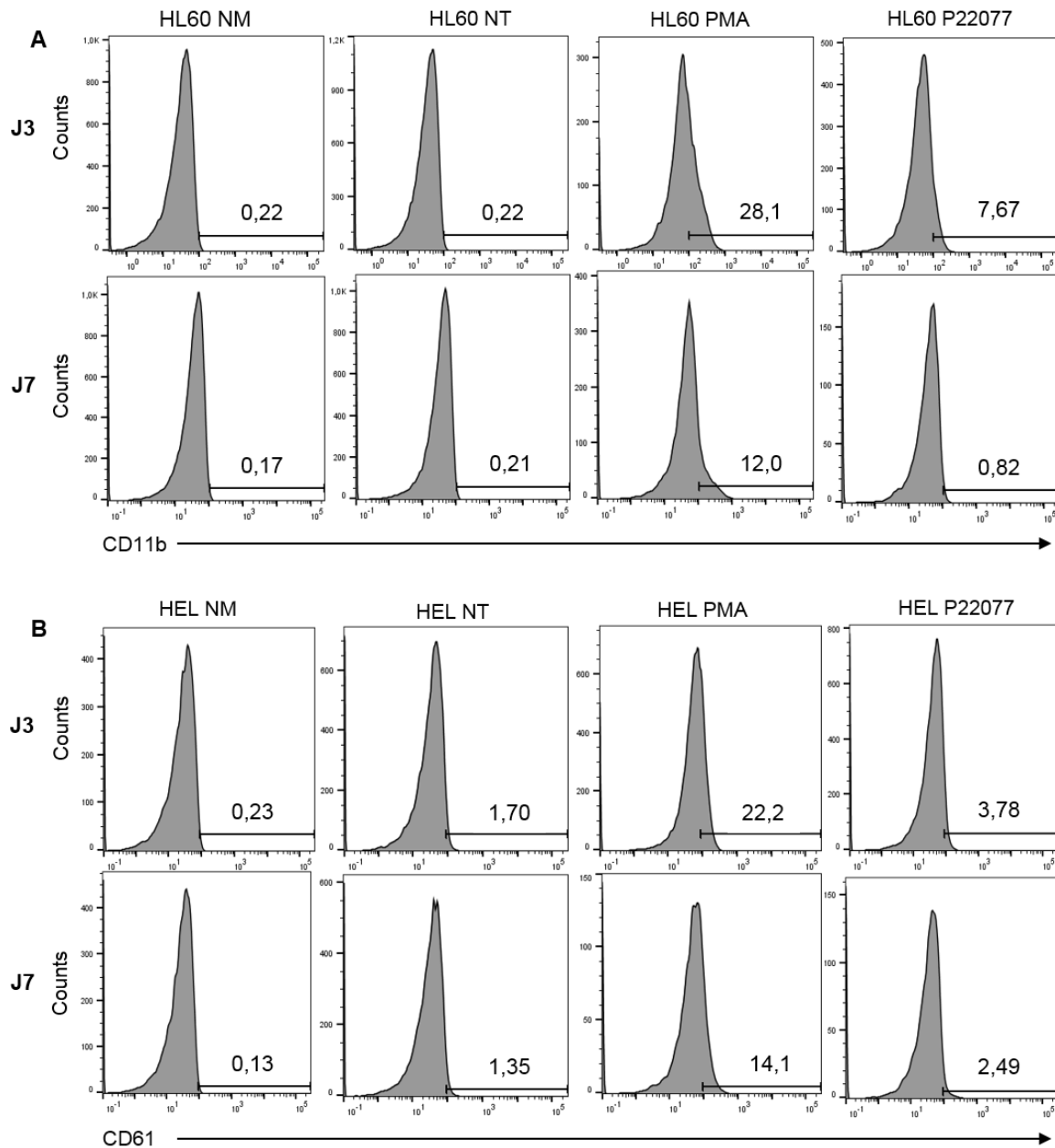
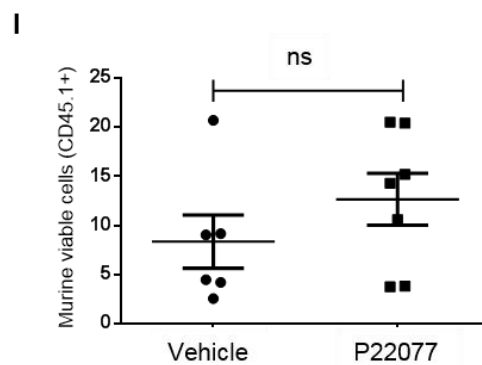
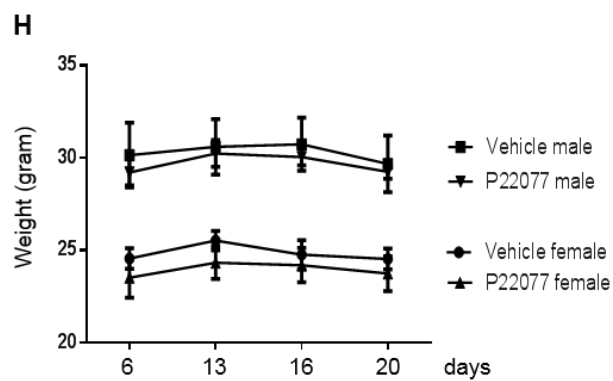
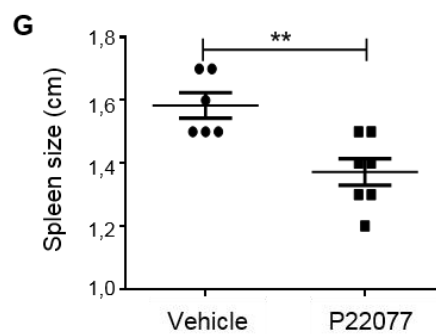
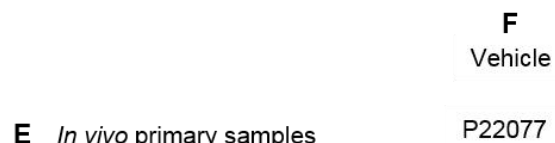
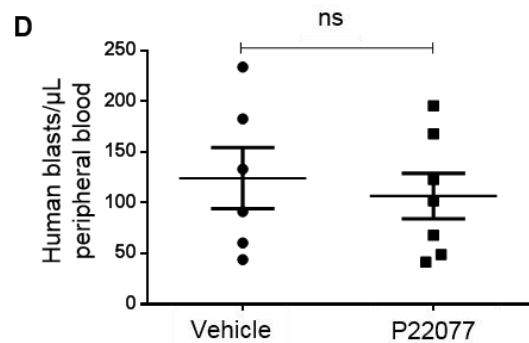
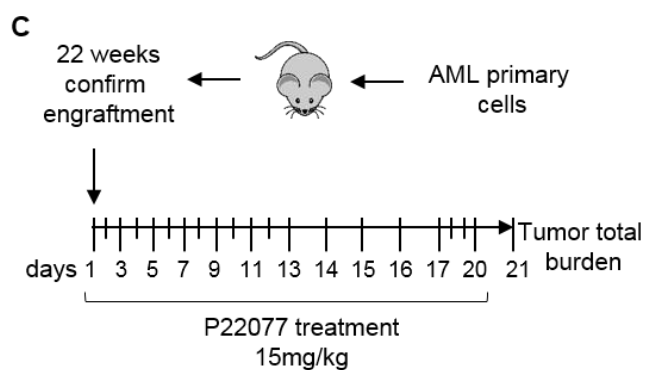
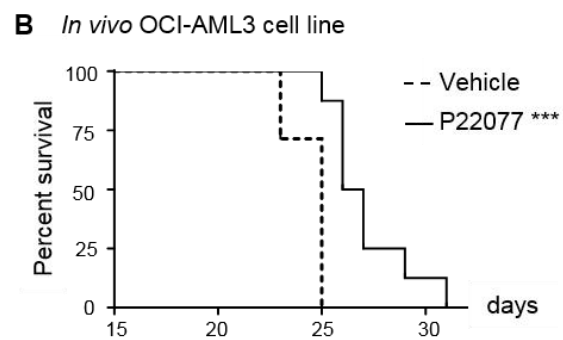
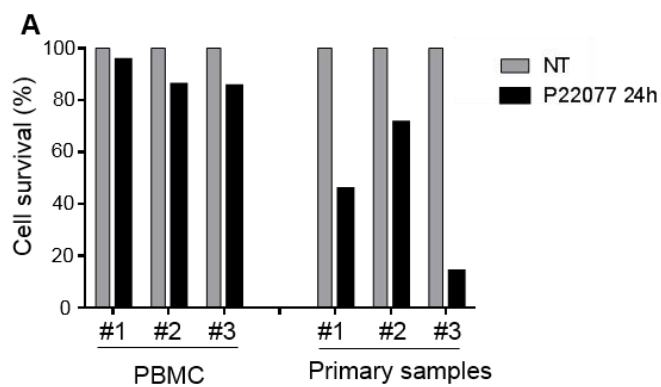


Figure 54 : L'inhibition d'USP7 ne stimule pas la différenciation des lignées leucémiques. A : Analyse du marqueur de surface CD11B dans la lignée HL-60 en condition non marquée (NM), non traitée (NT), stimulée au Phorbol Myristic Acetate (PMA 3 nM) ou traitée avec l'inhibiteur d'USP7 (P22077 10 μ M) pendant 3 et 7 jours. **B :** Analyse identique avec le marqueur de surface CD61 dans la lignée HEL.

Grâce à une étroite collaboration avec l'institut Universitaire du Cancer de Toulouse, j'ai pu obtenir des échantillons primaires « frais » de patients atteints de LAM, ainsi que des échantillons de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC pour peripheral blood mononuclear cells) de donneurs sains. J'ai donc utilisé ces différents échantillons primaires, en les traitant pendant 24 h avec le P22077 en culture liquide dans un milieu IMDM supplémenté avec 20% de SVF, afin d'évaluer l'impact de l'inhibition d'USP7. Comme montré dans la figure 55A, l'inhibition d'USP7 pendant 24 h réduit significativement la viabilité des cellules dans les trois échantillons primaires de patients atteints de LAM, contrairement aux cellules PBMC obtenues auprès de donneurs sains qui ne sont que peu affectées par ce traitement (Figure 55A). Ces résultats montrent que l'inhibition d'USP7 perturbe la viabilité des cellules leucémiques sans affecter la survie des cellules hématopoïétiques normales, laissant envisager que cette inhibition entraînerait peu de toxicité sur les cellules normales.

Au vu de ces résultats, l'effet de l'inhibition d'USP7 a ensuite été étudié *in vivo*.

Dans un premier temps, j'ai effectué une expérience de xénogreffe de la lignée cellulaire OCI-AML3 dans des souris immunodéprimées NOD SCID gamma (NSG). Brièvement, 2 millions de cellules OCI-AML3, exprimant un fort niveau protéique de CHK1 et USP7, ont été injectées dans la veine de la queue de souris NSG âgées de 6 à 9 semaines. Ces souris avaient préalablement été conditionnées pour recevoir une xénogreffe de cellules, puisque 24 h avant, une dose sub-létale de busulfan avait été injectée afin de tuer les cellules murines de la moelle osseuse. Vingt deux jours après l'injection des cellules, lorsque la maladie est établie, c'est-à-dire aux premiers signes physiques de la maladie, les souris ont été traitées quotidiennement pendant 5 jours avec l'inhibiteur d'USP7 à 30 mg/kg, et la survie des souris a été monitorée. Un traitement à l'inhibiteur d'USP7 allonge très significativement la survie de ses souris, comparativement à la condition contrôle (Figure 55B). Pour aller plus loin et toujours essayer de se rapprocher d'un modèle plus physiologique, j'ai effectué une nouvelle expérience *in vivo* avec des souris NSG, mais cette fois en effectuant une greffe de cellules primaires de patient atteint de LAM (PDX pour Patient-Derived Xenograft). Le plan expérimental est présenté sur la figure 55C et dans le matériel et méthode, mais brièvement, 3 millions de cellules primaires de patients ont été injectées dans la veine de la queue des souris NSG âgées de 6 à 9 semaines, pré-conditionnées pour recevoir la greffe grâce à une injection au Busulfan 24 h plus tôt. 22 semaines après la transplantation des cellules primaires, l'efficacité de prise de greffe a été analysée grâce à un prélèvement du sang des souris en rétro-orbital, et les blastes humains CD45+ CD33+ ont été identifiés par cytométrie de flux. Les souris présentant plus de 20 blastes par μ L de sang sont considérées comme correctement prises en greffe, et ont été réparties équitablement afin d'obtenir un niveau de greffe équilibré dans chaque cohorte au début du traitement (Figure 55D).



Les souris PDX ont donc été traitées par injections intrapéritonéales avec 15 mg/kg de P22077 3 jours par semaine pendant 2 semaines, puis quotidiennement pendant 1 semaine (Figure 55C). A la fin du traitement, les souris ont été sacrifiées afin de récupérer les cellules humaines de la moelle osseuse (tibias et fémurs), ainsi que de la rate. Une réduction significative du nombre total de blastes (Figure 55E), ainsi qu'une réduction significative de la taille de la rate (Figure 55F et G) sont visibles chez les souris traitées avec l'inhibiteur d'USP7 en comparaison aux contrôles, montrant une bonne réduction tumorale grâce au traitement. Il est important de noter que l'inhibiteur a été utilisé à des doses bien tolérées par les souris, puisqu'aucun impact sur le bien être des souris ni sur le poids n'a été observée au cours de l'expérience (Figure 55H). De plus, aucune toxicité n'est visible sur les cellules murines normales présentes dans la moelle (Figure 55I).

Figure 55 : L'inhibition d'USP7 permet une réduction tumorale *in vivo* et prolonge la survie des souris, sans toxicité pour les cellules normales. **A** : Des échantillons de cellules mononucléées du sang périphérique de donneurs sains (n=3) et des échantillons primaires de patients atteints de LAM (n=3) ont été traités avec 10 μ M de P22077 pendant 24 h, et la viabilité des cellules a ensuite été étudiée par cytométrie de flux (marquage annexinV/cell viability). Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo. **B** : Courbe Kaplan–Meier de survie des souris NSG greffées avec des cellules OCI-AML3, et traitées pendant 5 jours avec le P22077 (30 mg/kg/jour) ou le contrôle (vehicle = DMSO + huile de maïs). Un test statistique Mantel-Cox a été utilisé, *** $P \leq 0.001$. **C** : Représentation schématique de la chronologie du traitement des souris NSG. **D** : L'efficacité de prise de greffe a été mesurée par cytométrie de flux dans le sang périphérique des souris (rétro-orbital), 22 semaines après la xénogreffe. Les souris présentant au moins 20 blastes humain/ μ L de sang ont été assignées aux deux groupes expérimentaux pour obtenir des niveaux de prise de greffe équilibrés dans chacune des cohortes au début du traitement. 6 souris ont été assignées au groupe contrôle (Vehicle = DMSO + PBS) et 7 souris ont été assignées au groupe de traitement P22077. Un t-test a été utilisé pour l'analyse statistique, ns = not significant. **E** : Le nombre total de blastes humains viables (CD45+ et CD33+) dans la moelle osseuse et dans la rate a été analysé et quantifié par cytométrie de flux dans les souris traitées avec l'inhibiteur d'USP7 (P22077) en comparaison aux souris contrôles (Vehicle). L'analyse statistique a été effectuée grâce à un t-test non apparié * $P \leq 0.05$. **F** : Photographie des rates des souris traitées ou non avec l'inhibiteur d'USP7 (P22077) après le sacrifice. **G** : Graphique représentant la taille des rates des souris traitées avec le contrôle ou le P22077. L'analyse statistique a été effectuée grâce à un t-test non apparié avec correction de Welch. ** $P \leq 0.01$. **H** : Le poids de souris a été suivi au cours de l'expérience. La moyenne de chaque groupe est présentée au cours du temps en discriminant les mâles et les femelles. **I** : Le nombre de cellules murines viables a été analysé et quantifié par cytométrie de flux (CD45.1+) afin de déterminer la toxicité du P22077. L'analyse statistique a été effectuée grâce à un t-test non apparié avec correction de Welch. ns = non significatif.

J'ai également étudié la différenciation des blastes résiduels récupérés après traitement des souris. Malgré une tendance à l'augmentation visible pour tous les marqueurs, comme lors des expériences réalisées *in vitro* aucune différenciation significative n'est observée sur la différenciation myéloïde des cellules récupérées des souris traitées ou non à l'inhibiteur d'USP7 (Figure 56).

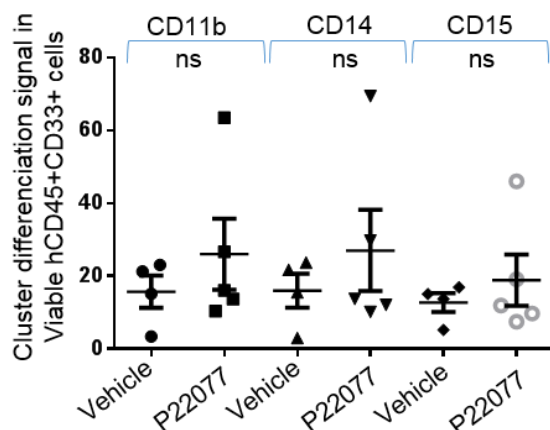


Figure 56 : L'inhibition d'USP7 *in vivo* ne modifie pas la différenciation des blastes. Analyse du marqueur de surface CD11, CD14 et CD15 dans les cellules primaires humaines en sortie de souris (CD45+ CD33+), après traitement des souris avec le P22077 ou le contrôle (Vehicle). L'analyse statistique a été effectuée grâce à un t-test non apparié avec correction de Welch. ns = non significatif.

L'ensemble de ces résultats obtenus sur des échantillons primaires et *in vivo* suggèrent que l'inhibition d'USP7 pourrait avoir un intérêt thérapeutique réel dans les LAM, notamment au vu de la bonne tolérance des cellules normales à cet inhibiteur.

Afin d'explorer si USP7 participe à la chimiorésistance dans les cellules leucémiques, j'ai étudié la capacité à sensibiliser les cellules HL-60 et OCI-AML3 à la cytarabine (AraC) avec l'inhibiteur d'USP7. L'ajout du P22077 à un traitement à l'AraC induit une augmentation significative de la mortalité dans ces deux lignées cellulaires (Figure 57A et B), donc de manière indépendante du statut p53, et cet effet se révèle être synergique (Figure 57C).

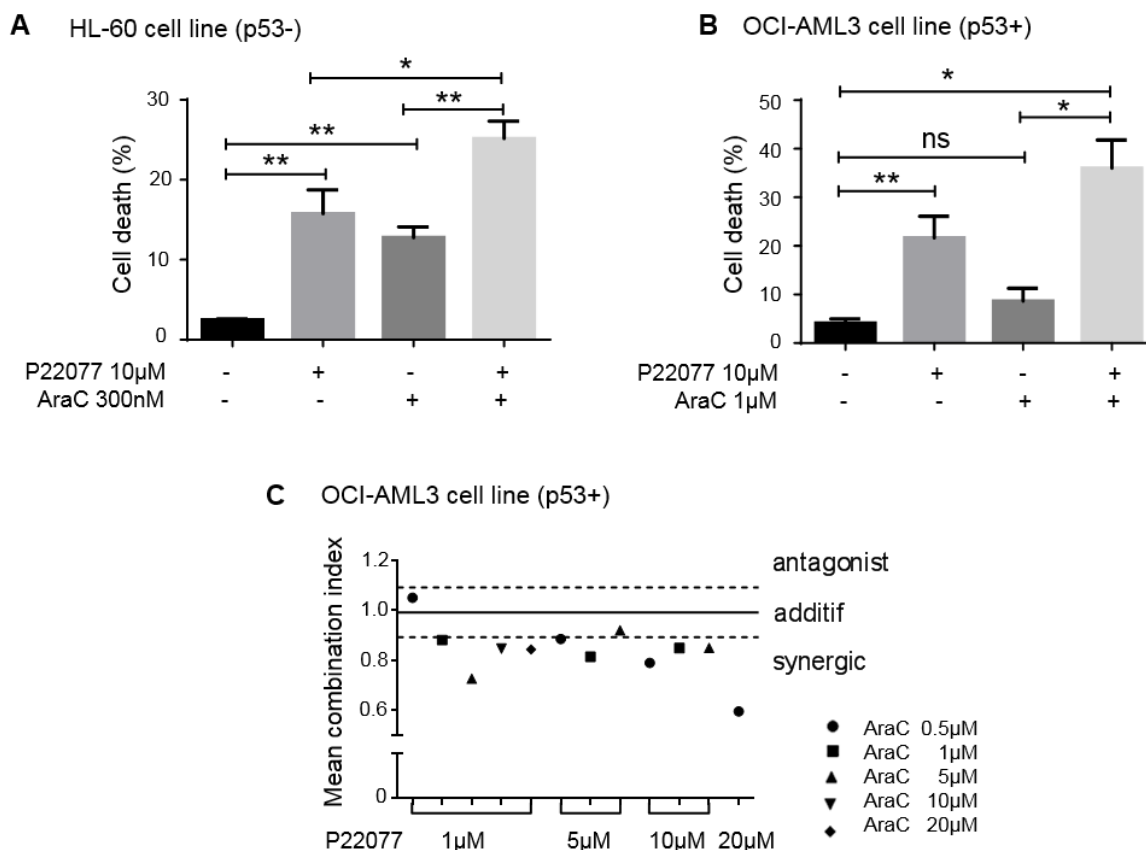


Figure 57 : L'inhibiteur d'USP7 agit de manière synergique avec l'AraC pour induire la mort des cellules leucémiques. A : Les cellules HL-60 ont été traitées avec ou sans l'inhibiteur d'USP7 P22077 (10 μM) et l'AraC (300 nM) pendant 24 h. La mortalité des cellules a ensuite été quantifiée par cytométrie de flux (marquage AnnexinV/cell viability). L'analyse statistique a été effectuée sur 4 expériences indépendantes grâce à un t-test non apparié, * $P \leq 0.05$ et ** $P \leq 0.01$. **B :** Les cellules OCI-AML3 ont été traitées avec ou sans l'inhibiteur d'USP7 P22077 (10 μM) et l'AraC (1 μM) pendant 24 h. La mortalité des cellules a ensuite été quantifiée comme pour A. L'analyse statistique a été effectuée sur 3 expériences indépendantes grâce à un t-test non apparié, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ et ns=non significatif. **C :** En utilisant une combinaison de traitement de P22077 et d'AraC aux concentrations indiquées, l'index de combinaison a été déterminé avec le logiciel CompuSyn. Le graphique représente l'indice de combinaison moyen obtenu avec 4 expériences indépendantes.

Comme décrit précédemment par l'équipe (David et al., 2016) l'expression de *CHEK1* est un marqueur pronostique indépendant dans les LAM et son abondance protéique est corrélée à la résistance à la cytarabine. Afin de déterminer si USP7 participe à la chimiorésistance des cellules leucémiques en régulant la stabilité de CHK1, j'ai mesuré la proximité entre CHK1 et USP7 par PLA dans des cellules traitées avec la cytarabine. Une augmentation significative de la proximité entre CHK1 et USP7 est observée dans les cellules HL-60 lors d'un traitement à la cytarabine (Figure 58A et B). La spécificité de cette interaction a été validée *via* l'utilisation du P22077 qui d'une part inhibe le site de liaison à l'ubiquitine limitant l'interaction avec ses partenaires, et d'autre part induit une diminution du niveau protéique de CHK1. Ainsi, une diminution significative du nombre de points de PLA est observée. Ces résultats suggèrent que USP7 jouerait un rôle en réponse à des dommages à l'ADN en stabilisant CHK1.

Pour mieux déterminer si cet axe USP7/CHK1 est impliqué dans la chimiorésistance, j'ai mesuré l'impact de différentes combinaisons de traitement avec le P22077, l'AraC et un inhibiteur de CHK1, le SCH900776 (Figure 58C). Comme décrit précédemment, la combinaison du P22077 à l'AraC augmente la mortalité des cellules en comparaison à l'utilisation de l'AraC seule. De manière intéressante, l'ajout de l'inhibiteur de CHK1 (SCH900776) dans ce contexte ne modifie pas la mortalité cellulaire, démontrant que la mortalité induite par l'ajout du P22077 passe en partie par cet axe USP7/CHK1.

Pour aller plus loin et conforter ces premières observations, j'ai étudié le potentiel clonogénique de cellules primaires de patients atteints de LAM, après exposition à l'AraC et au P22077 (Figure 58D et E). De manière très intéressante, l'inhibition d'USP7 dans les cellules primaires présentant un fort niveau protéique de CHK1 et USP7 potentialise les effets de l'AraC pour diminuer le nombre de colonies formées. A l'inverse la combinaison du P22077 et de l'AraC n'a aucun impact sur le nombre de colonies formées par les cellules primaires possédant un niveau protéique de CHK1 et USP7 faible.

Ces résultats indiquent que le P22077 améliore considérablement l'effet cytotoxique de l'AraC sur les cellules leucémiques en réduisant leur potentiel à former des colonies, principalement *via* son rôle sur CHK1. Dans la continuité de nos résultats antérieurs soulignant l'importance de CHK1 dans la résistance à la chimiothérapie des cellules de LAM (David et al., 2016), ces nouveaux résultats indiquent pour la première fois que le P22077 pourrait être un traitement intéressant pour surmonter la chimiorésistance de ces cellules, principalement *via* l'inhibition de la déubiquitylation de CHK1.

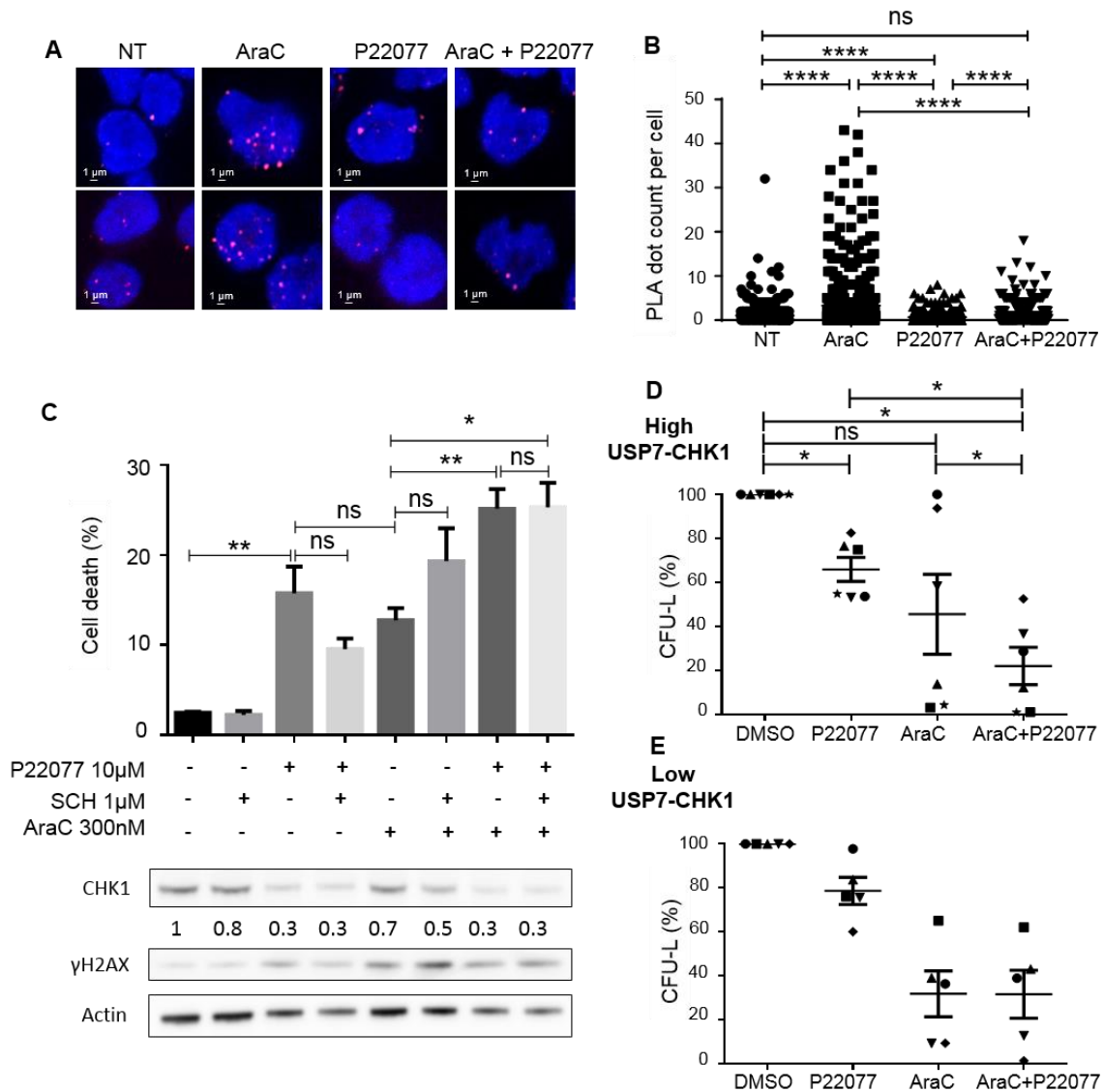


Figure 58 : Un traitement au P22077 potentialise les effets de l'AraC sur les lignées cellulaires et les échantillons primaires leucémiques *via* la perturbation de l'axe USP7/CHK1. **A** : Expérience de proximité de liaison (PLA) dans les cellules HL-60 effectuée en utilisant les anticorps dirigés contre USP7 et CHK1, et l'ADN a été colorée au DAPI. 16h avant la PLA, les cellules ont été traitées avec ou sans le P22077 (10 μM) et l'AraC (300 nM). Des images Z ont été acquises puis superposées par microscopie confocale. L'échelle représente 1 μm. **B** : La quantification des points rouges de PLA a été effectuée grâce au logiciel Zen et ImageJ à partir de 3 expériences indépendantes. Pour la PLA en condition non traitée (NT) moyenne=1,07±0,07 points/cellule avec 677 noyaux analysés ; condition AraC moyenne=3,31±0,21 points/cellule avec 743 noyaux analysés ; condition P22077 moyenne =0,68±0,04 point/cellule avec 604 noyaux analysés ; condition AraC et P22077 moyenne =1,24±0,10 points/cellule avec 407 noyaux analysés. *P*-values obtenues par un *t*-test non apparié, *P*<0.0001 ****. **C** : Les cellules HL-60 ont été traitées comme indiqué pendant 24 h. La mortalité cellulaire a été évaluée par cytométrie de flux (marquage annexinV/cell viability). L'analyse statistique a été effectuée par un *t*-test non apparié (n=4). * *P*≤0.05 and ** *P*≤0.01. En parallèle, des extraits cellulaires ont été collectés pour évaluer le niveau protéique par western blot. Un blot représentatif est présenté ici, et les ratios de l'expression de CHK1 sont présentés rapportés à l'actine. **D-E** : Analyse du potentiel clonogénique des cellules primaires de patients atteints de LAM, possédant un fort niveau protéique (High USP7-CHK1 n=6) ou un faible niveau protéique (Low USP7-CHK1 n=5) de USP7 et CHK1 par rapport à la médiane d'expression. Les cellules ont été exposées à un traitement d'AraC (10 nM) seul ou en combinaison avec le P22077 (5 μM). Le nombre de colonies formées a été évalué après 7 jours de culture en méthylcellulose par comptage au microscope. Le graphique représente le ratio du nombre de

clones rapporté à la condition contrôle (DMSO). L'analyse statistique a été effectuée grâce à un test non apparié de Wilcoxon. * $P \leq 0.05$, and ns = non significatif.

Avec l'ensemble de nos résultats révélant un rôle d'USP7 dans la résistance à la chimiothérapie, l'étape suivante a été d'évaluer si les cellules de LAM résistantes à la chimiothérapie possèdent une signature transcriptomique spécifique en lien avec USP7. Les niveaux d'USP7 ARN et protéique étant corrélés dans les échantillons de patients que j'ai pu analyser (Figure 59A), il n'est donc pas incohérent d'étudier une signature transcriptomique avec un fort niveau d'ARN d'USP7. En collaboration avec l'équipe de Jean-Emmanuel Sarry au CRCT, et particulièrement avec Pierre-Luc Mouchel, nous avons voulu établir une signature transcriptomique révélant les gènes fortement exprimés corrélés à USP7 dans les LAM. En utilisant les données de transcriptomique publiques de patient atteints de LAM dans la banque de donnée « Transcriptomic Cancer Genome Atlas (TCGA) », 41 gènes se sont révélés fortement exprimés en corrélation à un fort niveau d'USP7. Ces 41 gènes constituent donc la signature transcriptomique « High USP7 ». La liste des 41 gènes est disponible en Annexe 2. Nous avons ensuite pu confronter cette signature d'USP7 à une banque de donnée HACKL (HACKL cohort, GEO: GSE6891) ayant des informations transcriptomiques sur 11 patients atteints de LAM au diagnostic et à la rechute. De manière très intéressante, la signature « High USP7 » se révèle significativement enrichie dans le transcriptome des patients atteints de LAM au moment de la rechute (Figure 59B). De plus, la confrontation de notre signature « High USP7 » avec des données transcriptomiques publiées par l'équipe de Jean-Emmanuel Sarry (Farge et al., 2017 GEO: GSE97631) nous ont permis d'observer un enrichissement de notre signature dans le transcriptome des cellules primaires de LAM résistantes à un traitement chimiothérapique dans un modèle de xénogreffe dérivée de patient (PDX) (Figure 59C). Ensemble, ces résultats de transcriptomique révèlent qu'une signature correspondant à un fort niveau d'USP7 est retrouvée enrichie dans les cellules résistantes à l'AraC et dans les cellules présentes à la rechute. Un fort niveau d'USP7 pourrait donc représenter une signature prédictive de la chimiorésistance et de la rechute.

Enfin, pour encore mieux caractériser l'importance d'USP7 dans l'hétérogénéité tumorale, une analyse par cellule unique "Single Cell" a été réalisée par Pierre-Luc Mouchel, dans l'équipe de Jean-Emmanuel Sarry. Les cellules primaires d'un patient (IM10) atteint de LAM ont été collectées au diagnostic et après traitement conventionnel (anthracycline et cytarabine), puis les cellules ont été analysées par la technique Single Cell 10XGenomics permettant de quantifier les transcrits de chacune des cellules. A partir des différences d'expression des transcrits, les cellules ont été séparées en deux groupes transcriptionnellement différents (indiqués cluster sur la figure) (Figure 59D). De manière intéressant, l'étude Single Cell après traitement du patient révèle que le groupe 2 de cellules a presque complètement disparu, tandis que le groupe 1 de cellules reste présent chez le patient. Ce groupe représente les cellules résiduelles, donc résistantes au traitement, et une signature transcriptomique de ces cellules résistantes a été établie (Signature UP cluster 1 composée de 220 gènes fortement exprimés). Ces résultats révèlent qu'une population de cellules ayant une signature de résistance pré-existe au diagnostic. La

confrontation de cette signature dans deux cohortes publiques de transcriptomique de patients atteints de LAM au diagnostic (banques de données TCGA et Verhaak) révèle que cette signature de cellules résistantes (Signature UP Cluster 1) est retrouvée enrichie dans les échantillons de patients présentant un fort niveau d'USP7 (Figure 59E et F). Ce résultat signifie que les patients avec un fort niveau d'USP7 présentent au diagnostic des cellules avec une signature propice à la chimiorésistance. De manière très intéressante et en accord avec les résultats obtenus précédemment, l'étude par western blot de l'échantillon du patient utilisé pour le Single Cell (IM10) révèle que les protéines CHK1 et USP7 sont présentes à des niveaux élevés chez ce patient (Figure 59G).

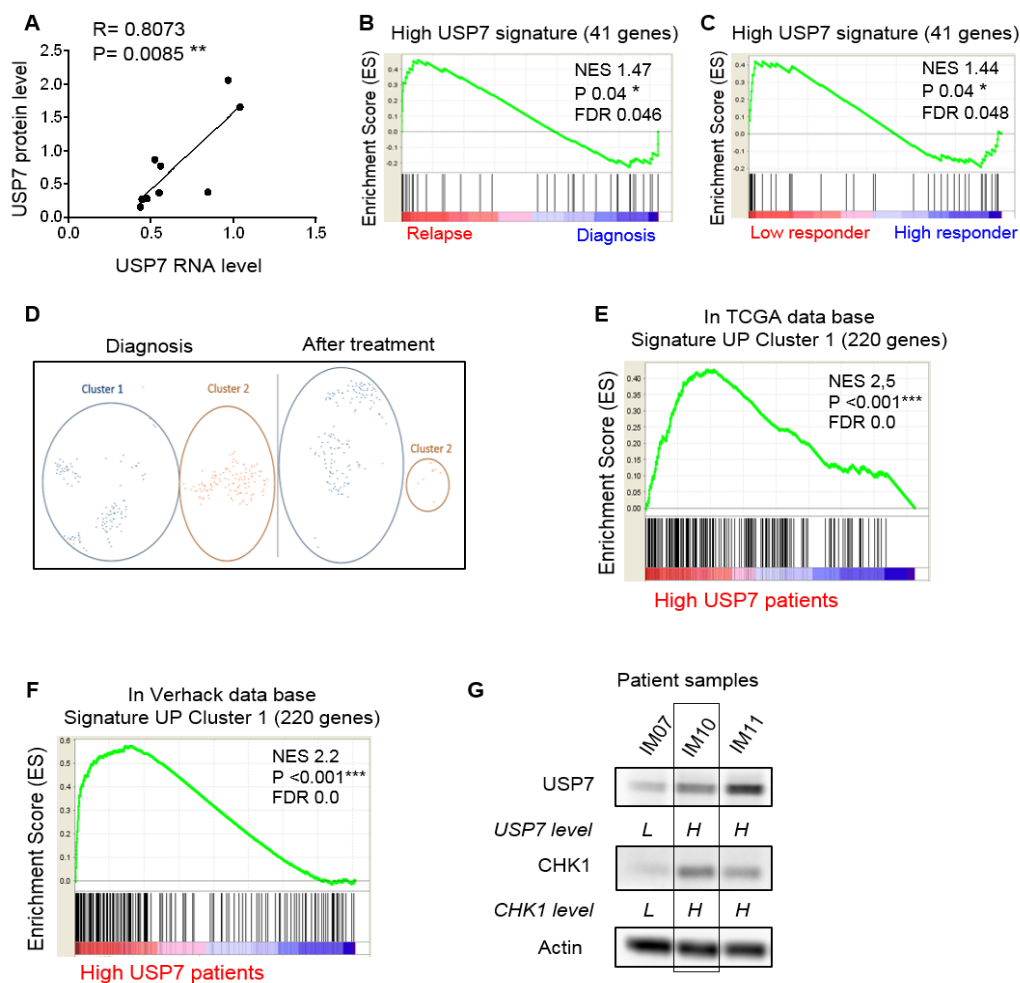


Figure 59 : Analyse transcriptomique de la signature d'USP7 dans les LAM. **A** : Régression linéaire de la corrélation entre l'ARNm d'USP7 et le niveau protéique dans 9 échantillons primaires de LAM. **B** : Analyse d'enrichissement de la signature "High USP7" dans des données transcriptomiques de patients atteints de LAM au diagnostic (bleu) et à la rechute (rouge). **C** : Analyse d'enrichissement de la signature "High USP7" dans des données transcriptomiques de patients atteints de LAM « bon répondeur » (bleu) ou « mauvais répondeur » (rouge) à l'AraC dans des modèles de PDX. Les bons ou mauvais répondeurs ont été définis si la réduction tumorale est inférieure ou supérieure à une réduction d'un facteur 10 (Farge et al., 2017). **D** : Matrice d'expression des ADNc du patient IM10 au diagnostic ou après traitement chimiothérapique. **E-F** : Analyse d'enrichissement de la signature des cellules du cluster 1 dans les données transcriptomiques TCGA (E) ou Verhaak (F). **G** : Western blot représentatif de plusieurs échantillons de patients atteints de LAM afin de déterminer l'expression d'USP7 et de CHK1 (H signifie que la protéine est fortement exprimée et L signifie qu'elle est faiblement exprimée par rapport à la médiane d'expression).

L'ensemble de ces données montrent que des niveaux élevés de USP7 sont associés à la chimiorésistance des cellules de LAM, responsables de l'initiation de la rechute après traitement chimiothérapique. Ensemble, ces résultats suggèrent donc que cette signature High USP7 est une signature prédictive de la résistance et de la rechute dans les LAM.

IV. Discussion

Précédemment, nous avons rapporté dans des travaux de l'équipe que CHK1 est exprimée de manière très hétérogène chez les patients atteints de LAM et qu'un niveau élevé de CHK1 constitue un marqueur de mauvais pronostic en terme de survie globale et favorise la résistance à la chimiothérapie (David et al., 2016). Lors de ce travail, les mécanismes responsables de cette hétérogénéité d'expression n'avaient pas été définis. Aujourd'hui, à travers les travaux réalisés au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence que USP7 est un régulateur clé du niveau de CHK1 dans les cellules de LAM, et que USP7 joue un rôle important dans la chimiorésistance et pourrait devenir un nouveau marqueur pronostic et une nouvelle cible thérapeutique dans les LAM.

Dans les résultats obtenus au cours de mon travail, l'inhibition pharmacologique ou l'invalidation d'USP7 entraîne une diminution du niveau protéique de CHK1, causée par une augmentation de son ubiquitylation, ainsi qu'une augmentation de la mortalité des cellules leucémiques. Bien que le spectre de substrat d'USP7 soit large, j'ai pu montrer que l'effet cytotoxique observé suite à l'inhibition d'USP7 passe en partie par la perte de CHK1 (Figure 58C-E). La dérégulation de cet axe USP7/CHK1 pourrait donc représenter le nouveau « talon d'Achille » de ces cellules résistantes. En effet, l'inhibiteur d'USP7 utilisé seul ou en combinaison avec l'AraC impacte fortement la prolifération et la viabilité de ces cellules leucémiques résistantes, exprimant un fort niveau protéique de USP7 et CHK1 en comparaison aux cellules présentant un faible niveau de ces protéines ou aux cellules mononucléées du sang périphérique de donneurs sains.

De manière intéressante, l'effet cytotoxique de l'inhibition d'USP7 dans les cellules leucémiques est visible, bien que seul 50% du CHK1 protéique soit perdu. En effet, que ce soit *via* l'utilisation de différents siARN dirigés contre USP7 ou par l'utilisation de l'inhibiteur P22077, une population résiduelle de CHK1 persiste toujours dans les différentes lignées cellulaires (Figure 51) et ne semble pas dépendante de sa localisation (Figure 52). Deux hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer la présence de cette population de CHK1 restante.

La première hypothèse est que USP7 pourrait cibler CHK1 dans un état particulier, par exemple phosphorylée sur un site spécifique, expliquant que l'ensemble du CHK1 présent ne soit pas régulée par USP7. En effet, cette kinase est décrite pour avoir plusieurs sites de phosphorylation régulant sa localisation ou son activation. Il serait donc intéressant d'étudier ces phosphorylations afin de déterminer

si USP7 stabilise plus particulièrement CHK1 phosphorylée sur un résidu. J'ai commencé à étudier cette hypothèse en regardant les sites de phosphorylation classiques de CHK1 que sont les sérines 317, 345, 296 et 280, mais l'obtention de résultats contradictoires ne me permet pas, pour l'heure, de conclure sur la régulation de la stabilité de ces formes phosphorylées de CHK1 par USP7. Les nouveaux sites d'auto-phosphorylation de CHK1 décrit récemment, les thréonines 378 et 382, pourraient également être étudiés, bien que l'induction d'un mutant constitutivement phosphorylé sur ces deux sites se soit révélé moins stable comparativement à la forme sauvage, *via* une dégradation par le protéasome (Gong et al., 2018). Seuls 8 sites de phosphorylations sont décrits à ce jour sur la protéine CHK1, et au vu des nombreux rôles de cette kinase, nous envisageons que d'autres phosphorylations puissent moduler son activité, sa localisation ou sa stabilité. En parallèle de mon projet principal de thèse et dans le but de mieux connaître la régulation de la kinase CHK1 en identifiant de nouveaux sites de phosphorylation, j'ai effectué une étude phospho-protéomique de CHK1 immunoprécipitée dans des cellules HL-60, en collaboration avec la plateforme de Protéomique de l'Institut Cochin dirigée par le Pr P. Mayeux. Lors de cette étude phospho-protéomique, 44% de la séquence de CHK1 a pu être couverte et 2 nouveaux sites de phosphorylation, non décrits dans la littérature actuelle, ont été identifiés : la thréonine 279 et la sérine 331. Nous n'avons pas encore pu caractériser la fonction de la phosphorylation de ces sites, mais l'objectif pour la suite du travail est donc d'étudier ces phosphorylations *via* l'utilisation de mutants obtenus grâce à la technique CrispR afin d'établir si ces sites ont un rôle dans la localisation subcellulaire, l'activité ou la stabilisation de CHK1, ainsi que la répartition dans le cycle cellulaire ou la survie des cellules. Ainsi nous espérons mieux comprendre la régulation de CHK1, que ce soit dans notre modèle de LAM mais également pour des études fondamentales.

La deuxième hypothèse permettant d'expliquer qu'un niveau résiduel de CHK1 persiste toujours après l'inhibition ou l'invalidation d'USP7 est que de nombreux autres régulateurs de CHK1 existent et peuvent assurer le maintien d'un niveau minimum de CHK1. En effet, USP7 n'est pas le seul régulateur de l'expression de CHK1 possible dans les LAM, et des travaux effectués pendant mon stage de master 2 m'ont permis de mettre en évidence que la stabilité de CHK1 semblait également régulée par la protéine E4F1 dans les LAM, comme décrit précédemment par Grote et ses collaborateurs dans des cellules MEF (Grote D., et al., 2015). Ainsi, grâce à d'autres régulateurs, la cellule pourrait garder un niveau minimum de CHK1.

Plusieurs hypothèses peuvent donc être posées pour expliquer cette proportion de CHK1 résiduelle. Mais quel que soit le mécanisme de régulation, la présence d'une population résiduelle de CHK1 suite à l'inhibition d'USP7 est justement très intéressante. En effet, les données de la littérature mettent en lumière qu'un faible niveau de CHK1 peut également favoriser le développement de cancer ou de résistances, comme décrit dans le cancer de la prostate ou des syndromes myélodysplasiques notamment en favorisant l'instabilité génétique (Lunardi et al., 2015 - Pellagatti et al., 2010 - Lam et al., 2004). Dans le contexte présent des LAM, le but est donc de diminuer le niveau de CHK1 dans les cellules de

patients résistantes à la chimiothérapie, sans perdre totalement CHK1. La perte de la moitié de CHK1 suite à l'inhibition d'USP7 est donc particulièrement intéressante, puisqu'elle permet de restaurer la sensibilité des cellules à la chimiothérapie, mais pourrait certainement contribuer à limiter l'apparition d'effets secondaires comme ceux observés en réponse aux inhibiteurs de CHK1 dans divers essais clinique (neutropénies, gastrites, données obtenues sur le site Clinical Trial).

Au-delà de l'intérêt de mieux comprendre la régulation de CHK1 dans les LAM, mes travaux, ont permis de mettre en évidence que USP7 elle-même pourrait constituer une cible thérapeutique très intéressante dans cette pathologie. En effet, j'ai mis en évidence que USP7 présente un niveau hétérogène dans les lignées cellulaires et dans les échantillons primaires de patients atteints de LAM, au niveau protéique et de l'ARN, et grâce aux études transcriptomiques, que les patients présentant la signature d'un fort niveau d'USP7 étaient plus enclin à la chimiorésistance et à la rechute (Figure 59B et C). L'analyse Single Cell effectuée permet de compléter ces résultats, puisque la signature des cellules résistantes est retrouvée chez les patients présentant un fort niveau d'USP7 dès le diagnostic (Figure 59D-F). Ainsi, ces résultats suggèrent que USP7 pourrait être utilisée comme un nouveau marqueur pronostique de la réponse à la chimiothérapie, et en conséquence devenir une nouvelle cible thérapeutique. Les résultats obtenus avec l'inhibiteur d'USP7 *in vitro* et *in vivo* vont dans ce sens, puisque la combinaison de l'inhibiteur d'USP7 et de l'AraC, et même l'utilisation de l'inhibiteur d'USP7 seul, permet de limiter la croissance tumorale des cellules résistantes à l'AraC, indépendamment du statut p53. Bien que la toxicité de l'inhibition d'USP7 nécessite d'être plus amplement étudiée *in vivo*, l'absence de toxicité observée sur les cellules mononucléées du sang périphérique de donneurs sains, ainsi que sur les souris (poids et viabilité des cellules murines de la moelle) nous permet d'envisager une utilisation d'inhibiteurs dirigés contre USP7 en thérapie.

De plus, bien que nous ayons établi que l'effet cytotoxique de l'inhibition d'USP7 soit médié en grande partie par la déstabilisation de CHK1 (Figure 58), nous sommes conscients que tous les effets ne passent pas par CHK1 et que d'autres voies sont certainement impliquées dans cet effet cytotoxique au vu du large spectre de substrats d'USP7. Ce grand nombre de substrats peut justement devenir un véritable atout lors de l'utilisation d'inhibiteur d'USP7 en thérapie, grâce au ciblage de plusieurs voies de signalisation, pouvant ainsi limiter l'apparition de résistances secondaires qui peuvent survenir suite au ciblage d'une seule voie.

Dans ce sens, MDM2 est justement un substrat d'USP7 dont la déstabilisation après inhibition d'USP7 dans les LAM pourrait avoir un réel intérêt. En effet, des études ont montré que MDM2 est surexprimée dans les LAM dû à des amplifications (Tovar et al., 2006 – Ray-Coquard et al., 2012), et que l'inhibition de MDM2 induit une mort par apoptose des cellules, notamment dans les cancers hématopoïétiques

(Kojima et al., 2005 – Long et al., 2010). Plusieurs essais cliniques ont eu lieu afin d'évaluer l'intérêt du ciblage de MDM2 (Ravandi et al., 2016 – Erba et al., 2019), et d'autres sont actuellement en cours pour tester l'effet d'inhibiteurs de MDM2 (Idasanutlin ou DS-3032b) en combinaison avec de la cytarabine chez les patients atteints de LAM (données disponibles sur Clinical Trial). Au vu de ces études, il serait intéressant de déterminer si l'inhibition d'USP7 perturbe la stabilité de MDM2 dans les LAM. Ainsi, cibler USP7 dans les LAM pourrait avoir un double intérêt en déstabilisant conjointement CHK1 et MDM2, conduisant à la mort des cellules leucémiques. De plus, le mécanisme d'induction de l'apoptose suite à l'inhibition de MDM2 implique p53, et malheureusement, des résistances à l'inhibition de MDM2 sont observées chez les patients possédant des mutations de p53 (Kojima et al., 2005 – Long et al., 2010). Dans mes travaux, j'ai à l'inverse montré que l'effet de l'inhibition d'USP7 dans les LAM semble indépendant de p53, puisqu'en utilisant des lignées exprimant de manière très différentielle p53, des effets similaires sur la mortalité des cellules sont observés. L'utilisation d'un inhibiteur d'USP7 pourrait donc devenir encore plus intéressant, grâce à son effet indépendant de p53, en déstabilisant plusieurs voies, dont CHK1. Cette hypothèse nécessite d'être étudiée, et le lien entre USP7 et MDM2 dans notre modèle devra être établi.

Pour aller plus loin dans la compréhension de la biologie des LAM et au vu de l'hétérogénéité d'USP7 dans cette pathologie et de son rôle, il serait intéressant de comprendre les mécanismes régulant l'expression d'USP7 dans ce contexte. Grâce à l'utilisation d'échantillons primaires de patients atteints de LAM, j'ai pu observer que les niveaux protéiques et d'ARN d'USP7 étaient corrélés (Figure 59A), laissant imaginer une régulation au niveau transcriptionnel d'*USP7*.

Comme présenté dans l'introduction de ma thèse, des études précédentes se sont justement intéressées à la régulation transcriptionnelle d'*USP7* dans les Leucémies Lymphoblastiques Aiguës T, et ont identifié que NOTCH induit l'expression d'USP7, et qu'une boucle de rétrocontrôle existe, où USP7 contrôle la stabilité de NOTCH (Shan et al., 2018 – Jin et al., 2018). Mais ce lien n'a pas été étudié dans les LAM.

De manière intéressante, notre étude transcriptomique nous permet d'envisager un lien entre USP7 et NOTCH dans les LAM car *DLK1* (Delta Like non-canonical Notch ligand 1) est retrouvé surexprimé dans la signature transcriptomique « High USP7 » (liste Annexe 2). *DLK1* est un gène codant pour Delta1, un ligand de NOTCH permettant l'activation de la voie, impliqué dans la prolifération de lignées et de cellules primaires de LAM. De plus, des études ont mis en évidence que les patients présentant une forte expression de NOTCH et Delta1 avaient une survie diminuée, suggérant qu'une activation de la voie NOTCH pourrait être associée à un mauvais pronostic dans les LAM (Xu et al., 2011b – Takam Kamga et al., 2016). Ainsi, ces études combinées à nos résultats de transcriptomique nous permettent d'imaginer un modèle où *DLK1* serait surexprimé chez certains patients souffrant de LAM, pouvant

conduire à une sur-activation de la voie NOTCH, induisant la transcription importante d'*USP7*. Ainsi, un axe Delta1/NOTCH/USP7/CHK1 pourrait être impliqué dans l'expression d'*USP7* dans les LAM et la chimiorésistance.

Pour conclure, cette première partie de mon travail de thèse apporte de nouvelles preuves sur la régulation de la stabilité de CHK1 par USP7 dans les cellules de LAM résistantes à la chimiothérapie. Après cette étude, l'intérêt d'*USP7* dans les LAM dépasse largement son seul rôle de régulateur de la stabilité de CHK1, puisque son inhibition a un réel effet seul et en combinaison avec l'AraC pour tuer les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*, et que cette déubiquitylase se révèle être un marqueur pronostic de résistance et de rechute. Ce travail appuie l'intérêt de poursuivre le développement de molécules inhibitrices d'*USP7* spécifiques et solubles, pour une inclusion future d'un inhibiteur dans des essais cliniques, et permet d'envisager une nouvelle thérapie ciblée pour les patients où la chimiothérapie est aujourd'hui en échec.

Partie 2 : Rôle et régulation de CHK1 au cours de la mitose

I. Contexte scientifique

Largement impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN, tant au niveau de la mise en place des points de contrôle que dans la réparation des dommages, le rôle de CHK1 dans le déroulement d'un cycle cellulaire normal, et notamment lors de la mitose, reste encore à éclaircir. En effet, plusieurs études apportent la preuve de l'existence de fonctions de CHK1 durant la mitose, indépendamment de dommages à l'ADN, où CHK1 va pouvoir bloquer l'entrée en mitose des cellules (Krämer et al., 2004 - Schmitt et al., 2006), ou permettre une bonne progression de cette phase. En effet, des travaux rapportent que l'haplo-insuffisance de CHK1 dans des modèles murins entraîne l'apparition de plusieurs défauts mitotiques tels qu'un défaut de fonction des kinétochores, et l'apparition de cellules binucléées (Peddibhotla et al., 2009). De plus, CHK1 est impliquée dans le bon alignement des chromosomes sur le plan équatorial, en régulant positivement le niveau et la localisation subcellulaire de Cdc20 et MAD2 (Yang et al., 2014), et négativement PLK1 afin d'inactiver le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (Tang et al., 2006). Bien que ces études mettent en lumière des rôles de CHK1 dans la bonne progression de la mitose, la régulation et les fonctions de CHK1 dans ce contexte ne sont pas encore complètement définies, et plusieurs questions persistent concernant les mécanismes précis et les cibles moléculaires de CHK1.

En plus de ses fonctions, la régulation de l'activation de CHK1 lors d'un cycle cellulaire non perturbé nécessite également d'être étudiée. Essentiellement décrite comme dépendante des phosphorylations en S345 et S317 par ATR (Toledo et al., 2011), l'importance et la nécessité de ces phosphorylations lors de fonctions de CHK1 indépendantes de la réponse aux dommages à l'ADN restent, pour l'heure, encore mal définies. En effet, d'autres sites de phosphorylation de CHK1 ont été identifiés depuis, et notamment le résidu sérine 280, décrit comme important dans la régulation de la prolifération des cellules leucémiques après phosphorylation par les kinases PIM1 et PIM2 (Yuan et al., 2014b). Pourtant, l'implication de cette phosphorylation dans la régulation de la prolifération cellulaire reste à préciser.

Ainsi, le but de ce travail était de mieux définir la régulation et le rôle de CHK1 au cours d'un cycle cellulaire normal, en étudiant particulièrement l'implication de CHK1 phosphorylée en sérine 280. Les premiers résultats de cette étude ont mis en évidence que la phosphorylation de CHK1 sur le résidu S280 est fortement augmentée lors de la phase G2/M dans plusieurs lignées cellulaires, suggérant un rôle important de cette fraction de CHK1 phosphorylée au cours de la mitose. Dans cette phase du cycle, nous montrons que PLK1 est directement phosphorylée par CHK1 sur le résidu activateur T210, et que cette phosphorylation de PLK1 par CHK1 est dépendante de la phosphorylation préalable de CHK1 en S280 par la kinase PIM2. Enfin, l'inhibition des kinases PIM réduit la prolifération des cellules en bloquant l'entrée en mitose, mais cet effet est restauré par l'expression d'une forme constitutivement active de PLK1 (T210D). Publié en août 2018 dans « Journal of Cell Science », le travail met en évidence un nouveau rôle de CHK1 indépendamment de la réponse aux dommages à l'ADN, en mettant

en lumière une nouvelle cascade de phosphorylation entre les kinases PIM/CHK1/PLK1 et leurs importances dans la régulation de la progression en mitose.

Ce travail a été réalisé en grande partie avant mon arrivée en thèse, mais j'ai eu l'opportunité de participer aux phases de révision de cet article. Ainsi, dans ce papier j'ai contribué à mettre en évidence que CHK1 phosphoryle directement PLK1 sur son résidu T210, permettant l'activation de PLK1. J'ai démontré que l'invalidation ou l'inhibition de CHK1 diminue la phosphorylation activatrice sur la T210 de PLK1, impactant la stabilité des substrats de PLK1.

II. Manuscrit

RESEARCH ARTICLE

A PIM-CHK1 signaling pathway regulates PLK1 phosphorylation and function during mitosis

Kévin Adam^{1,2,*}, Maëlle Cartel^{2,3,*}, Mireille Lambert^{1,2,*}, Laure David^{2,3}, Lingli Yuan⁴, Arnaud Besson³, Patrick Mayeux^{1,2,‡}, Stéphane Manenti^{2,3,‡} and Christine Didier^{2,3,‡,§}

ABSTRACT

Although the kinase CHK1 is a key player in the DNA damage response (DDR), several studies have recently provided evidence of DDR-independent roles of CHK1, in particular following phosphorylation of its S280 residue. Here, we demonstrate that CHK1 S280 phosphorylation is cell cycle-dependent and peaks during mitosis. We found that this phosphorylation was catalyzed by the kinase PIM2, whose protein expression was also increased during mitosis. Importantly, we identified polo-like kinase 1 (PLK1) as a direct target of CHK1 during mitosis. Genetic or pharmacological inhibition of CHK1 reduced the activating phosphorylation of PLK1 on T210, and recombinant CHK1 was able to phosphorylate T210 of PLK1 *in vitro*. Accordingly, S280-phosphorylated CHK1 and PLK1 exhibited similar specific mitotic localizations, and PLK1 was co-immunoprecipitated with S280-phosphorylated CHK1 from mitotic cell extracts. Moreover, CHK1-mediated phosphorylation of PLK1 was dependent on S280 phosphorylation by PIM2. Inhibition of PIM proteins reduced cell proliferation and mitotic entry, which was rescued by expressing a T210D phosphomimetic mutant of PLK1. Altogether, these data identify a new PIM-CHK1-PLK1 phosphorylation cascade that regulates different mitotic steps independently of the CHK1 DDR function.

This article has an associated First Person interview with the first author of the paper.

KEY WORDS: PIM2, CHK1, PLK1, Mitosis

INTRODUCTION

Checkpoint kinase 1 (CHK1, encoded by *CHEK1*) is a conserved serine/threonine protein kinase, widely known as a master regulator of the DNA damage response (DDR) pathway. Phosphorylation of its substrates, including p53, CDC25 or Wee1, leads to cell cycle arrest and the initiation of DNA repair, thus protecting against cell death induced by genotoxic stress. CHK1 knockout mice are embryonic lethal (Lam et al., 2004; Liu et al., 2000), and *Chk1*^{+/-} mice exhibit hematopoietic defects (Boles et al., 2010). CHK1-deficient blastocysts and embryonic stem cells also show severe

proliferation defects as well as an impaired cell cycle checkpoint response (Liu et al., 2000; Takai et al., 2000). Regulation of CHK1 activity by the upstream kinase ATR occurs through the phosphorylation of CHK1 on S345 and S317. Phosphorylation at these sites is considered to be a hallmark of CHK1 activation in cells. In addition, CHK1 phosphorylates itself on S296 to achieve full activation. Beside these well-described activating mechanisms, CHK1 phosphorylation on S280 by the mitogenic serine/threonine kinases AKT, p90RSK, and PIM1 and PIM2 (PIM1/2), was also recently reported in different models, with diverse consequences on CHK1 activity and its subcellular localization. Our own studies in leukemic cells have suggested that PIM1/2-dependent phosphorylation of this residue is crucial for resistance to DNA-damaging agents (Yuan et al., 2014a) and for cell proliferation in unperturbed conditions (Yuan et al., 2014b).

It is now clear that CHK1 also plays important roles in cell functions that are independent of the DDR pathway, although these pathways have not yet been fully established. CHK1 monitors DNA replication during unperturbed S phase, and there is evidence for its involvement in the control of replication origin firing, elongation and fork stability (Petermann et al., 2010; Guo et al., 2015). In addition to DNA replication, recent reports have documented the involvement of CHK1 in mitosis, particularly in regulating the initiation, progression and fidelity of unperturbed mitosis (Krämer et al., 2004; Enomoto et al., 2009; Tang et al., 2006; Zachos et al., 2007). In line with this, CHK1 haploinsufficiency in mice results in multiple mitotic defects such as cytokinetic regression and increased binucleation (Peddibhotla et al., 2009). CHK1 depletion in primary mammary epithelial cells isolated from *Chk1*^{+/-} mice also causes apparent defects in kinetochore function, activates the spindle assembly checkpoint, and eventually leads to mitotic catastrophe (Peddibhotla et al., 2009). Moreover, CHK1 appears to be essential for normal mitotic progression in HeLa cells and is involved in the proper alignment of chromosomes to the equatorial plane during metaphase, possibly via the regulation of PLK1, in order to inactivate the spindle assembly checkpoint (Tang et al., 2006). Other reports have described a functional interaction between CHK1 and the Aurora B kinase, leading to increased Aurora B kinase activity (Petsalaki et al., 2011; Zachos et al., 2007). Finally, the mitotic functions of CHK1 also involve the histone-dependent transcriptional regulation of CDK1 and its activating partner cyclin B1 (Shimada et al., 2008). Interestingly, CHK1 is also a target of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1). CHK1 can be phosphorylated at S286 and S301 by CDK1 during mitosis, promoting its translocation from the nucleus to the cytoplasm during prophase (Enomoto et al., 2009).

Together, these studies provide evidence for the existence of DNA damage-independent functions of CHK1 during mitosis; however, there are still many questions regarding the precise mechanisms involved and the identity of the molecular targets of CHK1 in this context. In this study, we established that CHK1

¹Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, 75014 Paris, France. ²Ligue Nationale Contre le Cancer, équipe labellisée. ³Cancer Research Center of Toulouse, INSERM U1037, CNRS ERL 5294, Université de Toulouse, 31100 Toulouse, France. ⁴Department of Hematology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, No.139 Renmin Middle Road, Furong, Changsha, Hunan 410011, China.

*These authors contributed equally to this work

§Author for correspondence (christine.didier@inserm.fr)

© L.Y., 0000-0002-9293-6388; C.D., 0000-0003-3979-0743

Received 13 November 2017; Accepted 15 June 2018

phosphorylation at S280 is strongly increased during mitosis and that PIM2 is the kinase controlling this phosphorylation. In turn, S280-phosphorylated CHK1 is able to directly phosphorylate PLK1 on its conserved T210 residue, leading to PLK1 activation. Taken together, these data identify a novel pathway governing CHK1-mediated regulation of PLK1 activity during mitosis.

RESULTS

CHK1 is a target of PIM2 during mitosis

We have previously established that interfering with CHK1 phosphorylation on S280 influences the proliferation rate of leukemic cells (Yuan et al., 2014a). In order to better understand the function of this phosphorylation in the regulation of cell proliferation, we first asked whether CHK1 phosphorylation on S280 was regulated during the cell cycle. For this, we followed the P-S280 level of CHK1 during cell cycle progression by western blot analysis of synchronization experiments. We used an antibody against phosphorylated S280 that we first characterized for its specificity and efficiency by western blot and immunofluorescence (Fig. S1A–C). In H1299 cells released from a thymidine block after serum starvation, the highest level of phosphorylation of S280 was observed during G2/M progression (Fig. 1A). Similar results were obtained with the human osteosarcoma U2OS and the hTERT-immortalized foreskin fibroblast hTERT BJ cell lines (Fig. S1D,E). Accordingly, CHK1 phosphorylation on S280 was strongly increased in HeLa, U2OS and hTERT BJ cell lines blocked in mitosis with nocodazole (Fig. 1B and Fig. S1F). These data indicate that CHK1 is maximally phosphorylated on S280 during mitosis, suggesting that S280 phosphorylation of CHK1 may play an important role in controlling its function during this phase of the cell cycle.

We then asked which kinase was involved in this phosphorylation event. The PIM, AKT and p90RSK family kinases have been reported to directly phosphorylate this residue in various cell types (Puc et al., 2005; Li et al., 2012; Yuan et al., 2014a). Thus, we tested the impact of inhibiting these kinases on CHK1 S280 phosphorylation in U2OS cells blocked in mitosis with nocodazole. As seen in Fig. 1C, inhibition of PIM1 and PIM2 (PIM1/2) for 4 h almost completely abolished S280 phosphorylation under these conditions, whereas inhibition of AKT only had a limited effect and MEK inhibition did not significantly modify S280-phosphorylated CHK1 (P-CHK1) levels. In order to rule out any indirect effects, we verified that the inhibitors did not significantly induce cell death (Trypan Blue staining, Fig. S1G) after 4 h of treatment. These results were confirmed by using RNA interference-mediated down-regulation of PIM1/2 in these cells, which also dramatically decreased CHK1 S280 phosphorylation (Fig. 1D). Altogether, these results strongly suggest that PIM1/2 are important inducers of S280 CHK1 phosphorylation during mitosis.

Cell cycle-dependent expression of PIM2 has never been reported. Therefore, we performed synchronization experiments in UT-7 cells, which are known to express high levels of PIM2 (Adam et al., 2015), in order to assess the expression profile of PIM2 during the cell cycle. As shown in Fig. 1E, PIM2 protein levels progressively increased during S phase and peaked during mitosis in these experiments, correlating with histone H3 phosphorylation levels. In contrast, PIM1 remained almost constant throughout the cell cycle. We then analyzed the ability of PIM2 to phosphorylate CHK1 on S280 *in vitro*, as we already established previously that PIM1 is involved in this phosphorylation in leukemic cells (Yuan et al., 2014a). Recombinant GST-CHK1 protein was incubated with purified PIM2 kinase in the presence of ATP (Fig. 1F), and CHK1 phosphorylation on S280 was then detected by western blotting. These experiments showed that PIM2 directly phosphorylates CHK1

on S280 as pharmacological inhibition (SGI-1776) of recombinant PIM2 kinase blocked this phosphorylation. We confirmed these results by overexpressing PIM2 in U2OS and HeLa cells, which led to a dramatic increase in CHK1 S280 phosphorylation (Fig. 1G). CHK1 S280 phosphorylation levels were also significantly increased in mitotic HeLa cells expressing an inducible PIM2 kinase (Fig. 1H). Altogether, these data indicate that PIM2 is a mitotic kinase that phosphorylates CHK1 on S280 during mitosis.

Subcellular localization of PIM2 and S280-phosphorylated CHK1 during mitosis

Our data describe for the first time that both PIM2 expression and CHK1 S280 phosphorylation are high during mitosis. We therefore investigated the subcellular localization of PIM2 and CHK1 during this phase. Since endogenous PIM2 is barely detectable by immunofluorescence, we used cells inducibly overexpressing the HaloTag-PIM2 fusion protein to study the subcellular localization of PIM2 in nocodazole-treated HeLa cells. For these experiments, co-staining was performed with an antibody against PLK1, a well-established marker of the different mitotic steps (Strebhardt, 2010). Indeed, PLK1 localization has been well characterized during mitosis, with centrosome, kinetochore and midbody localization consistent with its multiple mitotic functions. We detected PIM2 associated with spindle poles in metaphase, after which it then relocated to the equatorial plane where spindle microtubules overlap in the midzone as cells go through anaphase, and finally, it was observed in the midbody during cytokinesis (Fig. S2A). Interestingly, apparent co-localization of PIM2 and PLK1 was visible in these experiments, suggesting a possible functional link between these two proteins.

We then determined the distribution of S280-phosphorylated CHK1 during mitosis in H1299 cells (Fig. S2B), after validation of the anti-P-S280 antibody used in these experiments (Fig. S1B). During metaphase, phosphorylated CHK1 was found at the periphery of chromosome arms, as has already been described for the CHK1 protein (Peddibhotla et al., 2009). During anaphase, P-CHK1 was concentrated at the spindle midzone, and during cytokinesis, P-CHK1 accumulated at the midbody where it partly co-localized with citron kinase (Fig. S2C).

Based on these data, we then performed immunolabeling of P-CHK1 and PLK1 in U2OS (Fig. 2A) and HeLa cells (Fig. S2D), in order to investigate the subcellular localization of these two proteins during mitosis. The same localization patterns described above were observed, wherein P-CHK1 localized to the perichromosomal layer (PCL) during prometaphase, whereas PLK1 marked kinetochores. At this stage and during metaphase, both partners closely localized with each other (Pearson's coefficients of $r=0.612$ and $r=0.860$, respectively). At the onset of sister chromatid separation during anaphase, PLK1 was translocated to the spindle midzone and phosphorylated CHK1 foci partially co-localized with it. Finally, during cytokinesis, a small fraction of phosphorylated CHK1 co-localized with PLK1 at the midbody (Fig. 2A). To validate these observations, proximity ligation assays were performed to detect the co-localization of PLK1 with S280-phosphorylated CHK1 in U2OS cells treated or not with nocodazole. A significant proximity between the two proteins was visualized in nocodazole-treated U2OS cells, consistent with data obtained on normal growing (asynchronous) HeLa cells where we specifically visualized the mitotic cells (Fig. 2C). Similar results were obtained on UT-7 cells following nocodazole treatment (Fig. S2E). Together, these results indicate that a fraction of PIM2, P-CHK1 and PLK1 co-localize at distinct locations at different stages of the mitotic process (Fig. 2 and Fig. S2).

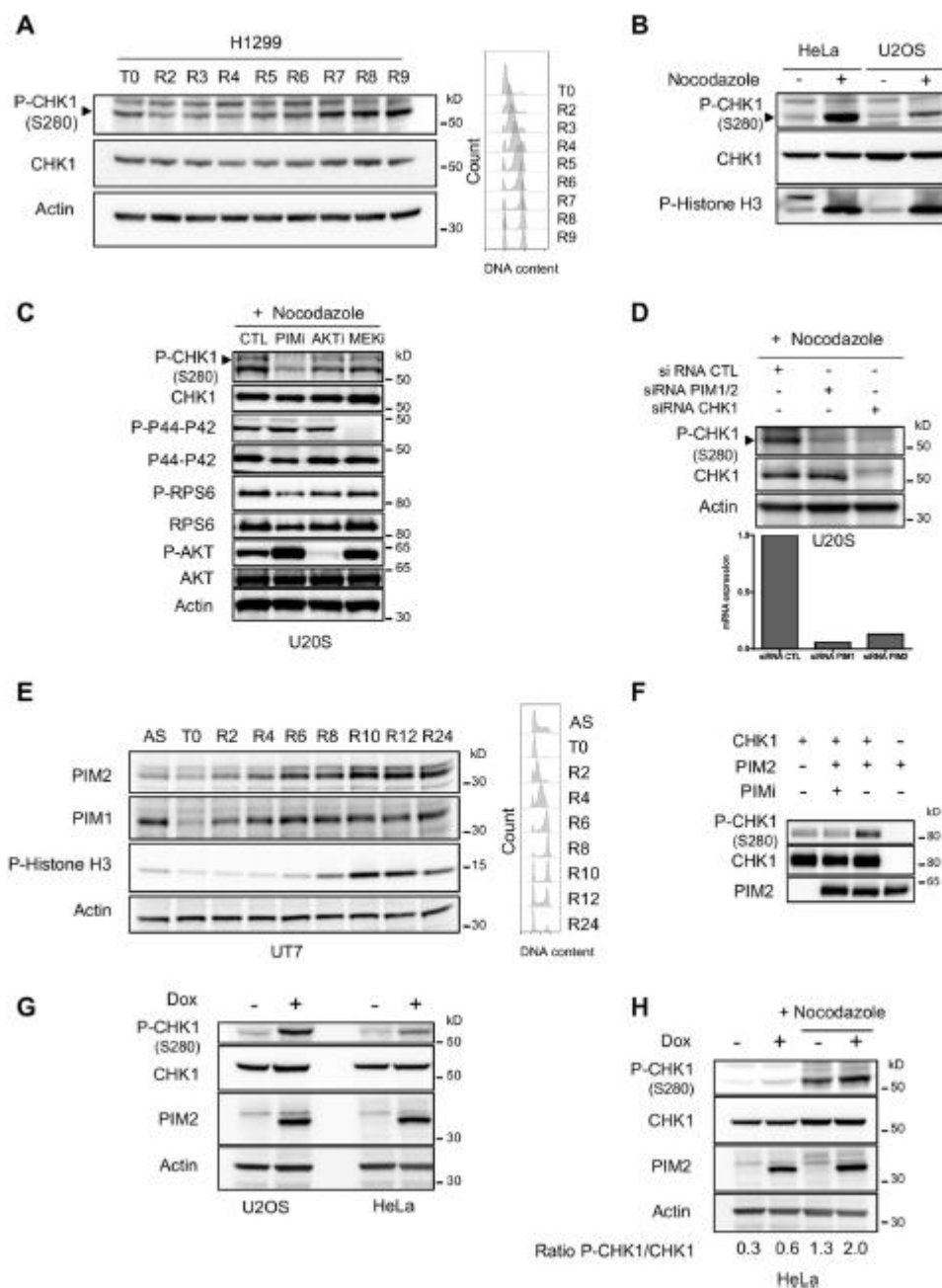


Fig. 1. PIM2 phosphorylates CHK1 in mitosis. (A) H1299 cells were synchronized by serum starvation followed by a thymidine block, and were then released at different times. P-CHK1, CHK1 and actin levels were analyzed with the antibodies indicated. In parallel, cell cycle distribution after synchronization was evaluated by FACS analysis (right). (B) S280 phosphorylation status of CHK1 in mitotic extracts of HeLa and U2OS cell lines. (C) Nocodazole (200 ng/ml)-treated U2OS cells were incubated for their final 4 h of culture with inhibitors targeting PIM (SGL-1776, 5 μ M), AKT (AKT inhibitor VIII, 4 μ M) or MEK (PD 0325901, 250 nM), before lysing cells and immunoblotting with the antibodies indicated. (D) U2OS cells were transfected with siRNA against PIM1 and PIM2 or CHK1, or with control siRNA (CTL) for 24 h. After a further 16 h incubation in the presence of nocodazole (200 ng/ml), cells were processed for immunoblot analysis. Data are representative of three independent experiments. (E) Double thymidine block (DTB) synchronization of UT7 cells. After release from the second thymidine block, cells were collected and cell extracts were analyzed for PIM1, PIM2, P-histone H3 and actin expression. Cell cycle progression is also shown in the insert on the right. (F) An *in vitro* kinase assay using PIM2 and CHK1 recombinant proteins was performed as described in the Materials and Methods, then CHK1 phosphorylation was evaluated by immunoblotting. (G) The effect of PIM2 expression on CHK1 phosphorylation was evaluated in U2OS and HeLa cell lines inducibly expressing PIM2 when treated with doxycycline (Dox, 2 μ g/ml). (H) Phosphorylation of CHK1 following the induced expression of PIM2 in a mitotic HeLa cell line. P-CHK1/CHK1 ratios are shown beneath the Western blot.

CHK1 phosphorylates PLK1 on T210 during mitosis

To test the possibility that PIM2, P-CHK1 and PLK1 functionally interact during mitosis, we then asked whether CHK1 and/or PIM kinases can regulate PLK1 phosphorylation on T210, a hallmark of PLK1 activation. RNA interference experiments performed in nocodazole-blocked U2OS cells demonstrated that down-regulating either CHK1 or PIM1/2 strongly decreased PLK1 T210 phosphorylation (Fig. 3A). Since cells are blocked with nocodazole in these experiments, it is unlikely that these effects on PLK1 phosphorylation are due to indirect cell cycle modifications. We further verified that RNA interference did not significantly change cell cycle profiles (Fig. S3A) or cyclin B expression (Fig. 3A) in order to rule out these indirect cell cycle distribution effects. Furthermore, we did not detect any cell death in these experiments (Fig. S3B). This observation was confirmed by pharmacological inhibition of CHK1 in H1299 nocodazole-treated cells (Fig. S3C). We then asked whether preliminary phosphorylation of CHK1 on S280 is necessary for its phosphorylation of PLK1. For this, PIM2 and CHK1 were co-transfected into U2OS cells, and the effect on PLK1 phosphorylation was monitored by western blotting. First of all, we noticed that CHK1 overexpression has an effect on overexpressed PIM2 levels probably due to some transfection issues. As shown in Fig. 3B, co-expression of PIM2 and CHK1 induced an important increase in PLK1 phosphorylation on T210. In contrast, when a S280A (SA) mutant of CHK1 was transfected instead of wild-type CHK1, PLK1 phosphorylation was not modified. These data indicate that phosphorylation of CHK1 on S280 is necessary for its kinase activity on PLK1. In addition, we verified that overexpression of wild-type CHK1 or the S280A mutant did not affect cell viability (Fig. S3D). The involvement of PIM2 in PLK1 activation was confirmed by inducibly expressing PIM2 in U2OS and HeLa cells (Fig. S3E), which showed that PIM2 expression led to an increase in PLK1 T210 phosphorylation. We then asked whether phosphorylation of PLK1 affected its co-localization with CHK1 in mitotic cells. For this we used proximity ligation assays to detect the co-localization of CHK1 with T210-phosphorylated PLK1 (Fig. 3C), in U2OS cells treated or not with nocodazole. A close association between CHK1 and PLK1 phosphorylated on T210 (red dots) was significantly increased in nocodazole-treated cells. The association of PLK1 and CHK1 during mitosis was also analyzed by co-immunoprecipitation experiments with a CHK1 P-S280-specific antibody in U2OS cells that had been co-transfected with CHK1 and PIM2, and blocked in mitosis by nocodazole treatment. In these cells, PLK1 co-immunoprecipitated with phosphorylated CHK1, confirming a close association between these two proteins in mitosis (Fig. 3D).

To determine whether CHK1 can directly phosphorylate PLK1, we then performed *in vitro* kinase assays. As shown in Fig. 3E, recombinant CHK1 was able to directly phosphorylate PLK1 on T210, while PIM2 did not. Interestingly, the presence of PIM2 in these experiments did not change the ability of CHK1 to phosphorylate PLK1 on T210, suggesting that S280 phosphorylation of CHK1 does not modify the catalytic activity of CHK1, but rather alters its capacity to phosphorylate PLK1 through the regulation of its localization and/or interaction with other proteins. To elucidate clearly the role of P-CHK1 in our experiments and after MS/MS analyses (Fig. S4), we observed that the commercial recombinant CHK1 protein is already phosphorylated on residue S280, in consequence, we produced wild-type and S280 mutant forms of CHK1. As shown in Fig. S3F, recombinant proteins used for *in vitro* kinase assay with one of its

well-defined substrates, CDC25C, presented good kinase activity (Fig. S3F). Then, we performed *in vitro* kinase assay with recombinant CHK1 WT and mutant proteins, PIM2 and PLK1, as shown in Fig. S3G. The results confirm the role of CHK1 in the phosphorylation of PLK1 and suggest that the S280A mutant does not significantly affect the catalytic activity of CHK1. Altogether, these data identify a phosphorylation cascade involving PIM2, CHK1 and PLK1 during mitosis.

PIM2 and CHK1 govern the phosphorylation and behavior of PLK1 substrates during mitosis

Finally, we asked whether interfering with PIM2 or CHK1 expression or activity modifies PLK1 function during mitosis in HeLa cells. For this, we followed the behavior of two well-described mitotic substrates of PLK1, EMI1 and WEE1. EMI1 is an anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) regulator, and its phosphorylation by PLK1 induces its proteasomal degradation (Margottin-Goguet et al., 2003; Hansen et al., 2007; Moshe et al., 2004). This is also the case for WEE1 kinase, a negative regulator of CDK activity, whose phosphorylation by PLK1 induces its degradation (Watanabe et al., 2004). We found that when CHK1 was down-regulated by RNA interference in HeLa cells, levels of EMI1 and WEE1 increased (Fig. 4A). To reinforce these observations, we performed five independent experiments including two siRNA sequences for CHK1, which also resulted in a significant accumulation of EMI1 and WEE1 proteins (Fig. 4B). Similarly, RNA interference-mediated down-regulation of PIM1/2 also induced the accumulation of EMI1 in HeLa cells (Fig. 4C), and decreased the phosphorylation of nucleophosmin (NPM1), another previously described substrate of PLK1 (Zhang et al., 2004). Moreover, treatment of siRNA-transfected cells with the protein synthesis inhibitor cycloheximide showed that WEE1 and EMI1 degradation was delayed when CHK1 or PIM kinases were down-regulated, indicating that CHK1 or PIM1/2 have a negative impact (decreased half-life) on the stability of these two proteins (Fig. 4D). Then, using an inducible PLK1 expression system that allows doxycycline-dependent expression of a constitutively active form of PLK1 (T210D) in HEK 293T cells (3×Flag T210D), we could significantly reverse the accumulation of WEE1 and EMI1 proteins under CHK1 or PIM1/2 downregulation (Fig. 4E). Finally, to substantiate our observations, we evaluated PLK1 activity more directly. For this, we immunoprecipitated PLK1 from HeLa cells treated with CHK1 (500 nM SCH900776) or PIM (5 μM SGI-1776) inhibitors for 16 h, and monitored PLK1 activity by estimating its capacity to phosphorylate two well-characterized substrates CDC25C (S75) (Gheghiani et al., 2017) and NPM1 (S4) (Zhang et al., 2004), in an *in vitro* kinase assay (Fig. 4F). These experiments showed that pharmacological inhibition of PIM1/2 or CHK1 significantly impairs PLK1 activity. Altogether, these results show that PIM1/2 and CHK1 kinases are involved in PLK1 regulation.

The PIM2-CHK1-PLK1 pathway is involved in cellular proliferation

Finally, we found that the functional interference of PIM1/2 activity either by siRNA or with a potent selective small-molecule inhibitor (SGI-1776) led to a significant inhibition of proliferation in HeLa, U2OS and H1299 cells (Fig. 5A,B). To further specifically investigate the role of the PIM2-CHK1-PLK1 axis in mitotic progression (G2/M transition), we used HEK 293T (3×Flag T210D) and the inducible PLK1 expression system previously described. These cells were synchronized in G2 by treating them with the CDK inhibitor RO3306 (10 μM) for 16 h, after which they were released

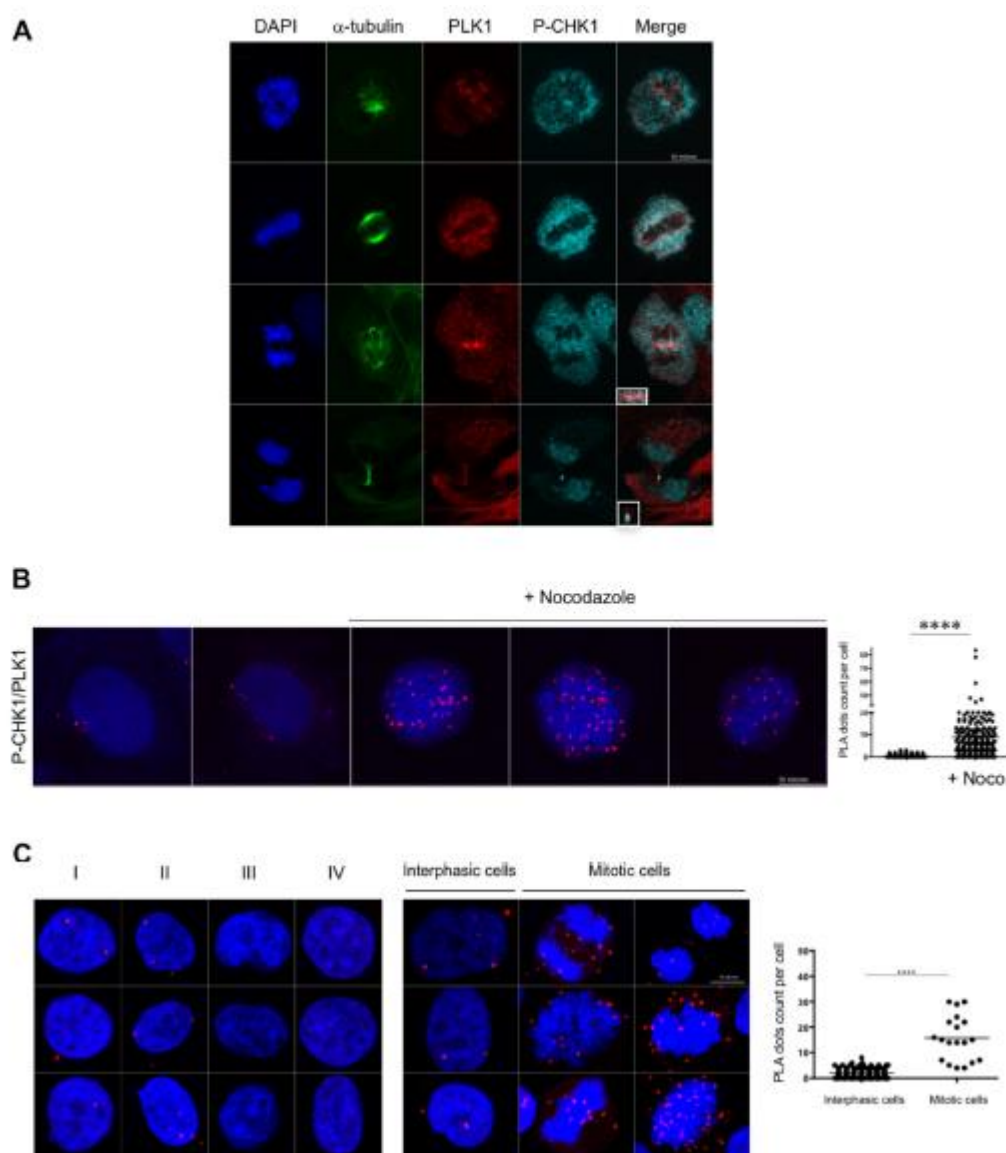


Fig. 2. Subcellular localization of S280-phosphorylated CHK1. (A) Representative confocal images of immunofluorescence staining for α -tubulin (green channel), PLK1 (red channel) and P-CHK1 (S280) (cyan channel) in U2OS cells. Selected high-magnification regions of interest are shown for anaphase and cytokinesis. (B) Proximity ligation assays using P-CHK1 and PLK1 antibodies on U2OS cells treated or not with 200 ng/ml nocodazole. DNA was counterstained with DAPI. Z-stack images were acquired ($n \geq 100$ nuclei) by confocal microscopy and quantification of the images was performed with ZEN and ImageJ software. The distribution of foci per cell is shown on the right. For co-staining of P-CHK1 and PLK1: 0.324 ± 0.047 foci/cell (mean \pm s.e.m.) from 182 nuclei analyzed under normal growing conditions, and 8.775 ± 0.703 foci/cell from 276 nuclei analyzed following nocodazole treatment. P -values were determined using the non-parametric t -test ($****P < 0.0001$). (C) Proximity ligation experiments were performed using the P-CHK1 and PLK1 antibodies on HeLa cells. DNA was counterstained with DAPI. Each antibody used was tested alone for their PLA signal [PLK1 (I); P-CHK1 (II)], then the species-specific secondary antibodies (PLA probes) alone (III) and all the mix without PLA probes (IV). Z-stack images were acquired by confocal microscopy and quantification of the images performed with ZEN and ImageJ software. The distribution of foci per interphasic versus mitotic cells is shown on the right. For co-staining with P-CHK1 and PLK1 antibodies: 1.935 ± 0.143 foci/cell from 139 nuclei analyzed for interphasic cells, and 15.680 ± 2.020 foci/cell from 19 nuclei analyzed from mitotic cells. Statistical analyses were performed as in B ($****P < 0.0001$).

in fresh medium supplemented or not with the SGI-1776 PIM inhibitor. After 7 h of culture in these conditions, the mitotic index was evaluated by flow cytometry to detect levels of phosphorylated histone H3. Inhibition of PIM1/2 kinase significantly reduced the

percentage of mitotic cells (from $60.03 \pm 3.33\%$ to $21.9 \pm 1.01\%$), but the concomitant expression of a constitutively active PLK1 mutant (T210D) in part compensated for PIM1/2 inhibition and increased the percentage of cells entering mitosis (to $34.9 \pm 1.05\%$) (Fig. 5C).

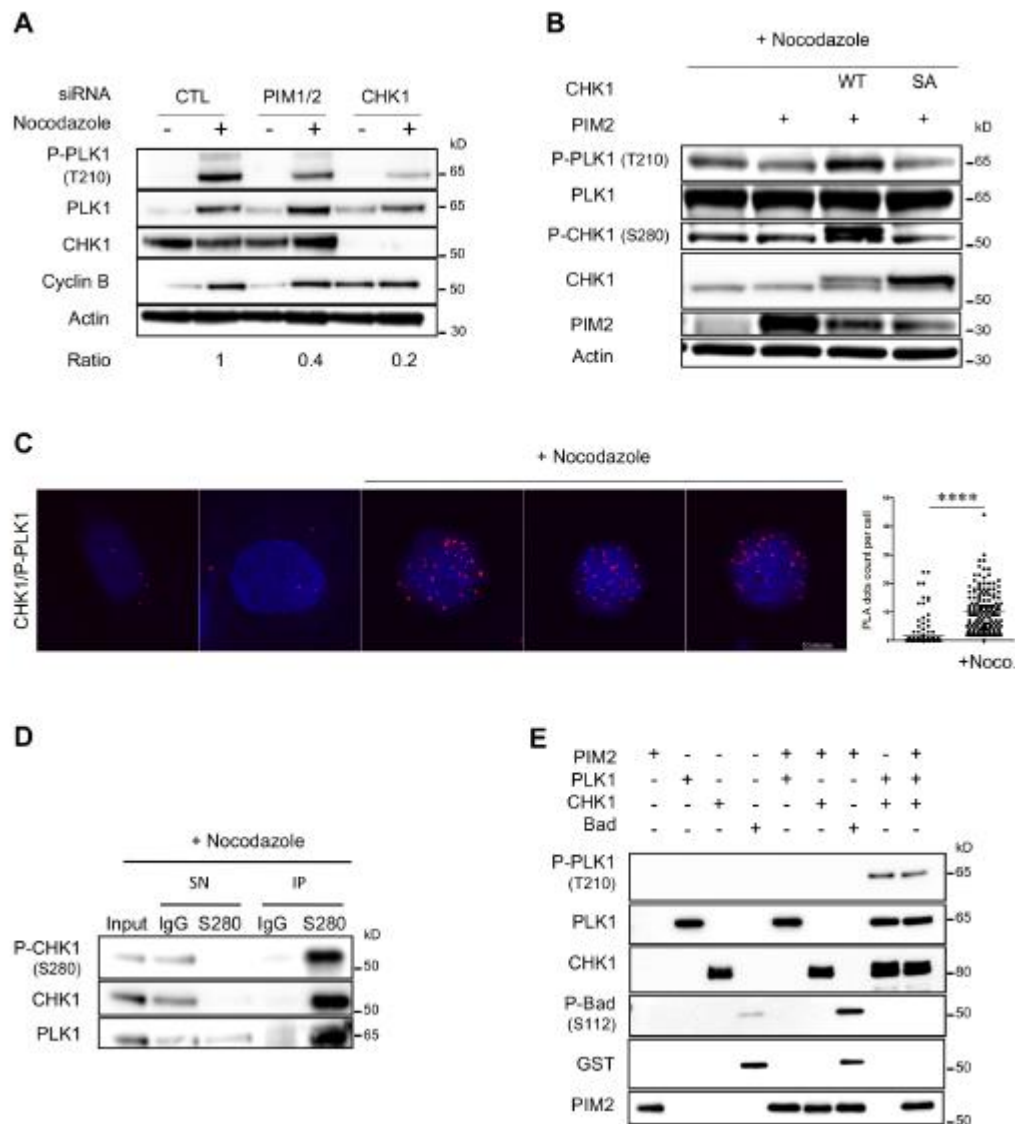


Fig. 3. CHK1 regulates PLK1 during mitosis. (A) U2OS cells were transfected with control siRNA or siRNA targeting PIM1/2 or CHK1 for 24 h, then arrested in mitosis by treatment with 200 ng/ml nocodazole for 16 h. Each fraction was subjected to immunoblotting with the indicated antibodies; actin served as loading control and was used for quantification. (B) U2OS cells were co-transfected with PIM2 and either wild-type CHK1 or CHK1 S280A mutant (SA) for 24 h, before being cultured for a further 16 h in the presence of 200 ng/ml nocodazole. Whole cell extracts were analyzed by western blotting with the corresponding antibodies. (C) Proximity ligation assays were performed using the CHK1 and P-PLK1 antibodies on U2OS cells treated or not with 200 ng/ml nocodazole. DNA was counterstained with DAPI. Z-stack images were acquired ($n \geq 100$ nuclei) by confocal microscopy and quantification of the images was performed with ZEN and ImageJ software. The distribution of number of foci per cell is shown on the right. For co-staining of CHK1 and P-PLK1: 1.556 ± 0.341 foci/cell (mean \pm s.e.m.) from 160 nuclei were analyzed under control conditions, and 9.948 ± 0.600 foci/cell from 154 nuclei analyzed following nocodazole treatment. P -value was determined using the non-parametric t -test ($****P < 0.0001$). (D) U2OS cells were co-transfected with CHK1 and PIM2 for 24 h followed by overnight nocodazole treatment (200 ng/ml), then immunoprecipitation was performed with the phospho-S280 antibody. The expression of CHK1, P-CHK1 and PLK1 was evaluated in the initial fraction (Input), the supernatant of the immunoprecipitation (SN) and the immunoprecipitated fraction (IP) by immunoblotting. (E) *In vitro* kinase assays were performed with PIM2, PLK1 and CHK1 recombinant proteins, and the levels of PLK1 phosphorylation evaluated by immunoblotting.

These results suggest that the PIM2-CHK1 pathway participates in PLK1 activation by controlling its phosphorylation. Taken together, our results indicate that PIM2 and CHK1 are upstream regulators of PLK1 function during mitosis and proliferation.

DISCUSSION

In the present work, we have identified the existence of a novel signaling cascade composed of the PIM2 and CHK1 kinases that leads to activation of the serine/threonine kinase PLK1 during mitosis. In addition to its well-described functions in the DNA

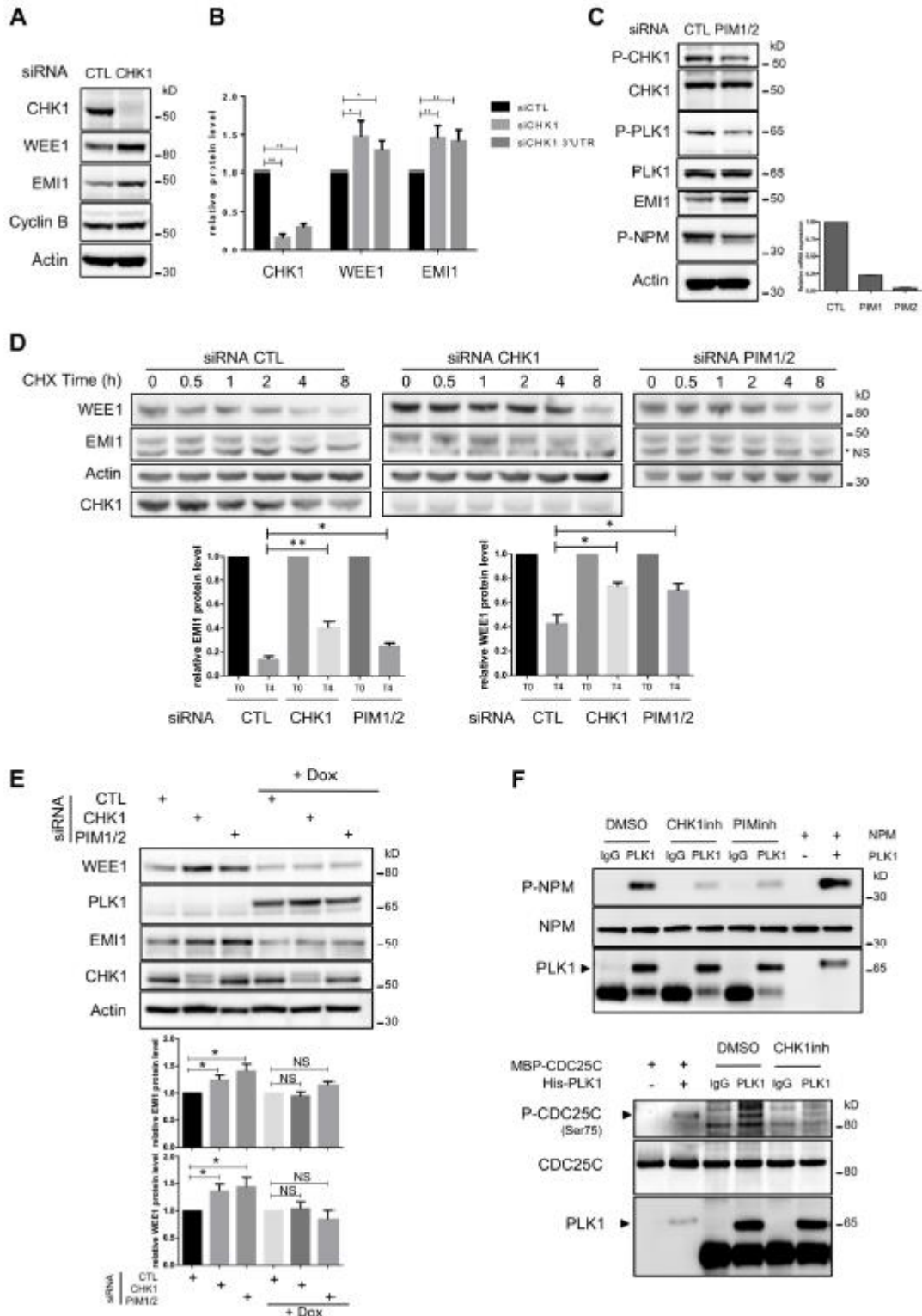


Fig. 4. PIM2 and CHK1 govern the phosphorylation of PLK1 substrates during mitosis. (A) To check the efficiency of the PIM2, CHK1 and PLK1 axis, HeLa cells were transfected with control siRNA and siRNA targeting CHK1 for 48 h. The corresponding fractions were then analyzed by immunoblotting with antibodies against the WEE1 kinase and EMI1, a major modulator of APC/C activity, whose stability is modulated via phosphorylation by PLK1. Actin was used as a loading control. (B) Quantification of CHK1, WEE1 and EMI1 protein level in HeLa cells transfected with control siRNA or siRNA targeting CHK1 (two siRNA sequences were used) for 48 h, then analyzed by western blotting. Relative CHK1, WEE1 and EMI1 protein levels were normalized to actin, and set to 1 for control transfected cells. Data are mean \pm s.e.m. of five independent experiments. For statistical analyses, non-parametric t-test was used ($^*P \leq 0.05$, $^{**}P \leq 0.01$ and $^{***}P \leq 0.001$). (C) Similar experiments were performed in HeLa cells treated with the indicated siRNA targeting PIM1 and PIM2 kinases for 48 h. Cell extracts were analyzed by immunoblotting and were probed with the corresponding antibodies. Quantitative PCR was carried out to evaluate the relative mRNA expression of PIM1 and PIM2 in these experiments. (D) HeLa cells were transfected with an siRNA control or siRNA targeting CHK1 (two siRNA sequences were used) or siRNA targeting PIM1 and 2 for 48 h, then cells were treated with cycloheximide (50 μ g/ml) for the indicated times, finally subjected to immunoblotting. The relative WEE1 and EMI1 protein levels were normalized to actin, and set to 1 for untreated cells. Graph represents the quantification of EMI1 and WEE1 protein level at T4 for the indicated conditions. Data are mean \pm s.e.m. of three independent experiments. Statistical analyses were performed as in B. (E) HEK 293T cells (3 \times Flag T210D) inducibly expressing the PLK1 mutant T210D were transfected with control siRNA, or siRNA targeting CHK1 or PIM1/2 for 24 h and then treated or not with doxycycline (200 ng/ml). Cell extracts were subjected to immunoblotting using indicated antibodies. The relative level of EMI1 and WEE1 was normalized to actin, and set to 1 for control transfected cells. Data are mean \pm s.e.m. of six independent experiments. Statistical analyses were performed as in B. (F) HeLa cells were treated with CHK1 (SCH900776-500 nM) or PIM (SGI-1776-5 μ M) inhibitors for 24 h, and cell lysates were used for immunoprecipitation of PLK1 protein. Immunoprecipitates were subjected to *in vitro* kinase assay with NPM or CDC25C recombinant proteins as described in the Materials and Methods. Phosphorylation levels were monitored by immunoblotting using indicated antibodies.

damage response, several studies have described an independent role for CHK1 in unperturbed cell cycle progression, particularly during mitosis. For instance, CHK1 can phosphorylate and enhance the activity of Aurora B, promoting the functions of this mitotic kinase in chromosome segregation and cytokinesis (Petalaki et al., 2011; Zachos et al., 2007). A role for CHK1 in the regulation of the BubR1-Mad2-Cdc20 complex and PLK1 have also been described (Zachos et al., 2007; Chilà et al., 2013; Tang et al., 2006), although these different studies have not provided a comprehensive picture of the general impact of CHK1 on mitotic progression. Here, we show that CHK1 directly phosphorylates PLK1 on its conserved activating T210 residue, and thereby positively regulates the diverse functions of PLK1 during mitosis. Since STK10, SLK and Aurora A have also been previously characterized as direct mediators of PLK1 phosphorylation at T210 (Walter et al., 2003; Macûrek et al., 2008; Seki et al., 2008), it remains to be clarified how these different kinases coordinate their activities to phosphorylate and activate PLK1.

Although CHK1 activation has been described as essentially dependent on ATR-mediated phosphorylation on S345 and S317, it remains unclear whether this mechanism is necessary for its DDR-independent functions. Indeed, several lines of evidence suggest that CHK1 can phosphorylate its substrates independently of ATR. For instance, during the G2/M transition, CHK1 is localized to the chromatin where it phosphorylates histone H3 on T11 to trigger the transcriptional expression of the mitotic effectors CDK1 and cyclin B1, allowing the cells to enter into mitosis (Shimada et al., 2008). In addition to its phosphorylation on S345 and S317 by ATR, CHK1

can also be phosphorylated on S280 by AKT, p90RSK or PIM1/2 – serine/threonine kinases that are involved in the activation of the major oncogenic signaling pathways PI3K-AKT, MEK-ERK and STAT5, respectively. The first publication in this field reported that S280 phosphorylation by AKT in PTEN-mutated cells inhibited CHK1 function by sequestering the protein to the cytoplasmic compartment (Puc et al., 2005). More recently, p90RSK was also found to phosphorylate CHK1 on S280 in response to growth factor stimulation of quiescent cells, but surprisingly, in this case it promoted its nuclear accumulation and activation rather than inhibition (Li et al., 2012). Finally, we recently documented that PIM kinases are involved in the phosphorylation of this residue in leukemic cells, in which these kinases are often overexpressed and play an important oncogenic role. In a previous study, we found that this phosphorylation had no detectable effect on CHK1 subcellular localization but did improve the DNA damage-dependent functions of CHK1 (Yuan et al., 2014a), as well as its capacity to stimulate leukemic cell proliferation (Yuan et al., 2014b). The reason for the apparent discrepancies between these different models is not yet clear, but one possibility is that the pathways responsible for CHK1 S280 phosphorylation and the resulting effects on its function differ between cell types and, perhaps, according to growth conditions. Here, we provide an additional and more general account of CHK1 regulation by its phosphorylation on S280, by demonstrating that this is an important parameter of CHK1 function during mitosis, and that PIM1/2 kinases are responsible for this mitosis-specific phosphorylation in different cellular models. Moreover, one important question that remains unresolved is the importance of CHK1 kinase catalytic activation (S296 phosphorylation) versus S280 phosphorylation in terms of regulating changes in its subcellular localization. In a previous work from Li et al. (2012), the authors did not observe any significant modulation of S296 phosphorylation following S280 phosphorylation by p90RSK *in vitro*. In light of this result, we speculate that this residue may act as a platform to recruit specific partners that may be involved in CHK1 activation and localization.

Although it has been previously involved in the regulation of cell cycle proteins, such as the CDK inhibitor p27^{Kip1} (Morishita et al., 2008), this is the first time to our knowledge that PIM2 has been described as a mitotic kinase. We found that its expression increased during mitosis, implying that its activity also increased since PIM2 is constitutively active and does not need post-translational (phosphorylation) activating modifications (Adam et al., 2015). In contrast to PIM2, PIM1 kinase has been previously involved in the regulation of mitosis. PIM1 interacts with and phosphorylates the nuclear mitotic apparatus protein NuMA (Bhattacharya et al., 2002) in a process that is important for maintaining a stable complex between NuMA, dynein-dynactin and HP1 β , which links chromosomal kinetochores to spindle microtubules. In addition, PIM1 overexpression results in genomic instability by over-riding the mitotic spindle checkpoint (Roh et al., 2003). Finally, the co-localization of PIM1 with PLK1 has been described at the centrosome and midbody (Van der Meer et al., 2014), suggesting a functional interaction between these two proteins for mitotic progression. It is difficult, however, to correctly distinguish the specific cellular functions of PIM1 or PIM2 since these two kinases can compensate for each other in many circumstances. Understanding how PIM1 and PIM2 precisely regulate the different mitotic steps at the molecular level, and how they mutually complement or compensate for each other, still remains a challenging task. Our work implicates PIM2 as a regulator of CHK1 during mitosis, and it will be interesting to determine

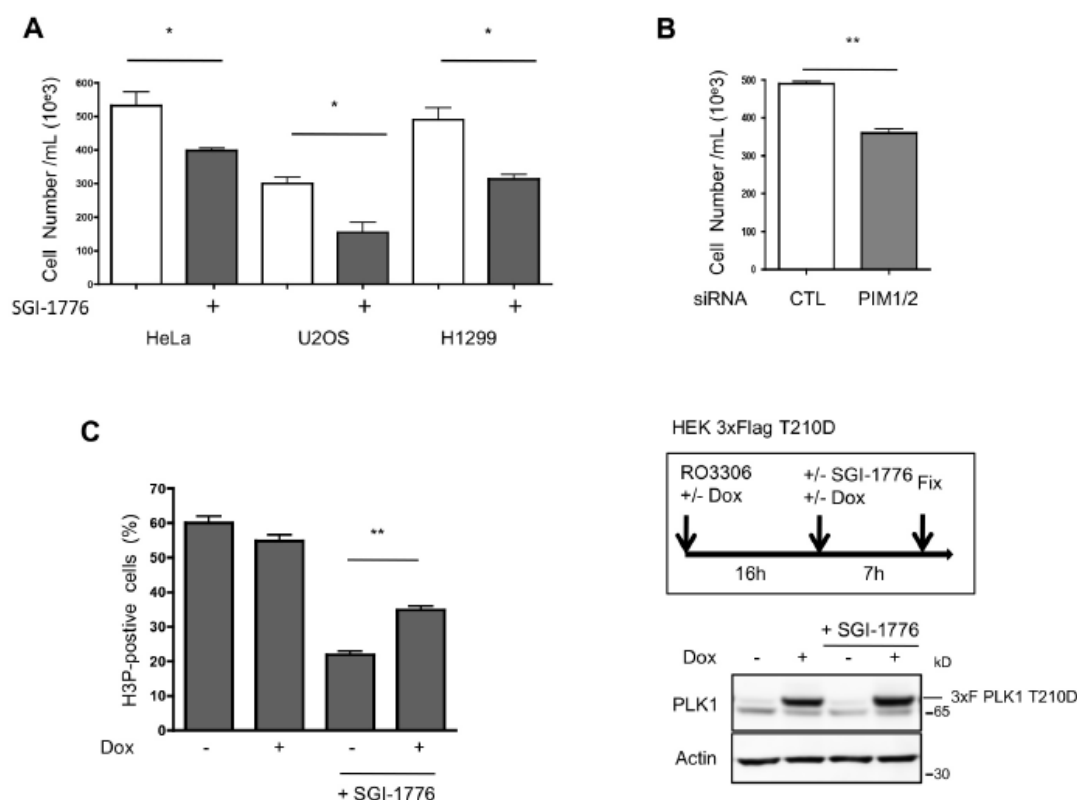


Fig. 5. The PIM2-CHK1-PLK1 axis regulates cellular proliferation. (A) HeLa, U2OS and H1299 cells were treated with PIM inhibitor SGI-1776 (5 μ M) for 48 h then cell numbers were assessed by Trypan Blue staining. (B) Similar experiments were performed with RNA interference against PIM1/2 in HeLa cells after transfection for 48 h. (C) The effect of PIM inhibition on mitotic entry in G2-synchronized HEK 293T cells, and compensation with a constitutively active form of PLK1 (T210D). Using HEK 293T cells (3 \times Flag T210D) inducibly expressing the PLK1 mutant T210D, cells were synchronized in G2 by treatment with CDK inhibitor RO3306 (10 μ M) for 16 h in the presence or not of doxycycline (200 ng/ml). Immediately after release from G2 synchronization, cells were cultivated for 7 h with or without doxycycline (200 ng/ml) and/or PIM inhibitor (SGI-1776; 5 μ M) and 200 ng/ml nocodazole in fresh medium. The mitotic index was then evaluated by FACS analysis (see schematic). Immunoblotting was carried out to control PLK1 T210D mutant expression. *P*-values were determined with the non-parametric *t*-test (***P*=0.003).

whether this function can also be performed by PIM1 in specific cellular contexts.

The functional interaction between PIM1/2, CHK1 and PLK1 during mitosis has important implications in the field of cancer biology and therapy. Indeed, it has been shown recently that the inhibition of PLK1, by either shRNA or the pharmacological inhibitor BI2536 in prostate cancer cells overexpressing PIM1, resulted in a dramatic inhibition of tumor progression. Moreover, compared with control cells, PIM1-overexpressing cancer cells are more prone to mitotic arrest followed by apoptosis due to PLK1 inhibition (Van Der Meer et al., 2014). These results suggest that over-activation of this newly identified signaling pathway due to the overexpression of one of its components could sensitize cancer cells and lead to its inhibition. This may be of particular interest in the case of acute myeloid leukemia (AML), since (i) PIM2 kinase is widely overexpressed in AML and is considered to be a potential therapeutic target for this pathology (Tamburini et al., 2009); (ii) we reported that PLK1 is often overexpressed in AML (Renner et al., 2009); and (iii) its pharmacological inhibition blocks proliferation and induces apoptosis in leukemic cell lines, and dramatically inhibits the clonogenic potential of primary cells from patients. Finally, we recently identified CHK1 expression as an independent prognostic marker in AML (David et al., 2016), and we described its

regulation by PIM2 phosphorylation in these tumors (Yuan et al., 2014a; Yuan et al., 2014b). Altogether, these data suggest that targeting the PIM2-CHK1-PLK1 pathway in AML may constitute an interesting alternative or may complement chemotherapies for the treatment of these pathologies.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and treatments

Human non-small cell lung carcinoma H1299 cells were maintained in RPMI containing 10% fetal calf serum (FCS). Human bone osteosarcoma epithelial cells (U2OS), the human adenocarcinoma HeLa cell line, human hTERT-immortalized foreskin fibroblasts (hTERT BJ), and U2OS or HeLa cells expressing the HaloTag-PIM2 fusion protein, were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and 1% penicillin-streptomycin (PS). For synchronization, human leukemic cells (UT-7) were grown in DMEM containing 10% FCS and 10 ng ml⁻¹ GM-CSF at 37°C with 5% CO₂. The doxycycline-dependent expression system allowing the induction of a constitutively active form of PLK1 (T210D) in HEK 293T cells (3 \times Flag T210D) was kindly provided by Dr Laurent Créancier (Pierre Fabre Laboratories, Toulouse, France). To establish the HaloTag-PIM2 fusion protein-inducible system, a lentiviral expression vector pLenti PGK Blast DEST (Life Technologies) was modified by the insertion of the HaloTag cDNA (Promega) into the *AgeI* site. Then, the PIM2 isoform 2 cDNA sequence was placed in phase with HaloTag thanks to the Gateway system.

The final construct was used to produce lentiviral particles to transduce HeLa and U2OS cells, and stable clones were selected by using 2 µg/ml blasticidin.

Cytokines, pharmacological inhibitors and reagents

Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Doxycycline, nocodazole, the CDK1 inhibitor (RO3306) and thymidine were obtained from Sigma-Aldrich (France). The CHK1 inhibitor (SCH900776) was purchased from Active Biochem (Clintscience, France). The PIM (SGI-1776) and MEK (PD0325901) inhibitors were from Selleckchem (Euromedex, France). The AKT inhibitor VIII was from Calbiochem (Merck Millipore, France). Other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (France). The protein synthesis inhibitor cycloheximide was obtained from Sigma-Aldrich (France).

Transfection

For siRNA transfection into HeLa or U2OS cells, Genome control pool non-targeting siRNA (Dharmacon) or CHK1 siRNA (Sigma-Aldrich) was transfected using 8 µl INTERFERin (Polyplus) in 6-well plates, as described by the manufacturer. For transfection of expression vectors, 2 × 10⁶ U2OS cells were resuspended in 100 µl Nucleofector Kit V, according to the manufacturer's instructions (program x-001-Amara, Cologne, Germany). Experiments were performed 48 h after transfection.

Immunoblotting

The procedures used for gel electrophoresis and immunoblotting have been described previously (David et al., 2016). Briefly, cells were lysed directly in NuPAGE LBS sample buffer, then sonicated and heated at 95°C for 5 min. Samples were subjected to electrophoresis in NuPAGE 4–12% Bis-Tris pre-cast gels (Life Technologies). CHK1 was detected with mouse monoclonal antibodies (clone G4, cat. no. sc-8408, Santa Cruz Biotechnology), PLK1 by mouse monoclonal antibodies (clones PL6/PL2, cat. no. 33-1700, Invitrogen), PIM2 by rabbit polyclonal antibodies (clone H-73, cat. no. sc-28778, Santa Cruz Biotechnology), P-PLK1 by rabbit monoclonal antibodies (clone D5H7, cat. no. 9062, Cell Signaling Technology), P-Bad (S112) by rabbit polyclonal antibodies (cat. no. 5284, Cell Signaling Technology), P-histone H3 (S10) by rabbit polyclonal antibodies (cat. no. 9706, Cell Signaling Technology), Cyclin B1 by mouse monoclonal antibodies (clone GNS1, cat. no. sc-245, Santa Cruz Biotechnology), P-Chk1 (S280) by rabbit polyclonal antibodies (cat. no. AP3069a, ABGENT), P-p44-p42 (Erk1/2, T202/Y204) by mouse monoclonal antibodies (clone E10, cat. no. 9106, Cell Signaling Technology), p44-p42 (Erk1/2) by rabbit polyclonal antibodies (cat. no. 9102, Cell Signaling Technology), P-RPS6 by rabbit monoclonal antibody (clone 2P9, cat. no. 4856, Cell Signaling Technology), RPS6 by rabbit monoclonal antibody (clone 5G10, cat. no. 2217, Cell Signaling Technology), P-AKT (S473) by rabbit monoclonal antibodies (clone D9E, cat. no. 4060, Cell Signaling Technology), AKT by rabbit polyclonal antibodies (cat. no. 9272, Cell Signaling Technology), Emi1 by rabbit polyclonal antibodies (cat. no. 38-500, Zymed), WEE1 by mouse monoclonal antibodies (clone B11, cat. no. sc-5285, Santa Cruz Biotechnology), P-NPM (S4) by rabbit monoclonal antibodies (cat. no. 3520, Cell Signaling Technology), P-CDC25C (S75) by rabbit polyclonal antibodies were kindly provided by Dr Olivier Gavet (Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France), P-CDC25C (S216) by rabbit polyclonal antibodies (cat. no. 9528, Cell Signaling Technology), CDC25C by rabbit polyclonal antibodies (cat. no. sc-327, Santa Cruz Biotechnology), NPM by mouse monoclonal antibodies (cat. no. AB10530, Abcam), P-NPM (S4) by rabbit polyclonal antibodies (cat. no. 3520, Cell Signaling Technology), and actin by mouse monoclonal antibodies (clone C4, cat. no. MAB1501, Santa Cruz Biotechnology). All antibodies are used at 1:1000 dilution. Secondary antibodies conjugated to HRP were used after incubation with primary antibodies. Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (PI32209; Thermo Fisher Scientific) with a Syngene camera. Quantification of chemiluminescent signals was done with the GeneTools software (v.1.4.0.0) from Syngene.

Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% formaldehyde in 1 × PBS at room temperature for 15 min, then permeabilized with 0.5% Triton X-100 in 1 × PBS, as

previously described (David et al., 2016). Briefly, cells were stained with the indicated antibodies and slides were mounted with ProLong Gold antifade reagent containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (P36931 from Invitrogen-Life Technologies). Images were acquired using a Zeiss confocal microscope (LSM780) and were subsequently processed using the ImageJ or ZEN software packages.

For proximity ligation assays, cells were washed twice with 1 × PBS, fixed with 4% paraformaldehyde then permeabilized. Unspecific proteins were blocked with 3% FBS containing 0.1% Triton X-100 in 1 × PBS for 30 min at room temperature. Cells were then incubated with either primary antibodies against CHK1 (DSC-310, cat. no. C-9358, Sigma, 1:400) and P-PLK1 (cat. no. 9062, Cell Signaling Technology, 1:200) or P-CHK1 (cat. no. AP3069A, ABGENT, 1:200) and PLK1 (cat. no. 37-7100, Zymed, 1:400). Then, cells were incubated with the appropriate DNA-linked secondary antibodies (Duolink kit, Sigma), and PCR *in situ* amplification was performed using the PLA technology, according to the manufacturer's instructions. The PLA signal was detected with a Zeiss confocal microscope. A series of Z-stack confocal microscopy images was taken and quantification of the images was carried out using ImageJ software. The HaloTag System was used according to the manufacturer's recommendations in combination with the previously described immunofluorescence protocol.

Cell synchronization, apoptosis and cell cycle analysis

Cells were synchronized by serum starvation coupled with either a thymidine block (2.5 mM), a double thymidine block (2.5 mM), or nocodazole treatment (200 ng/ml), then cell cycle distribution was analyzed. Briefly, cells were harvested and fixed in ice-cold 70% ethanol at −20°C. Cells were then permeabilized with 1 × PBS containing 0.25% Triton X-100, resuspended in 1 × PBS containing 10 µg/ml propidium iodide and 1 µg/ml RNase, and incubated for 30 min at 37°C. Staining for mitotic cells was conducted using phospho-histone H3 (S10) antibodies (cat. no. 06-570, Merck Millipore, 1:133). Apoptotic cells were detected with Annexin-V-FITC detection kit from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Trypan Blue stain (GIBCO, Life Technologies, CA, USA) was also used to evaluate cell death. Data were collected on a MACSQuant VYB Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and analyzed using FlowJo v.10 software.

In vitro kinase assays

Human PIM2 (SignalChem), PLK1 (Enzo Life Sciences) and GST-CHK1 (Enzo Life Sciences) recombinant proteins were incubated in 30 µl kinase buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.01% Brij35, 2 mM DTT) at 30°C for 60 min. The potent selective small-molecule inhibitor (SGI-1776) was used as control of the specificity of the PIM2 kinase activity. Analyses were performed by immunoblotting.

To generate expression vector permitting production of a fusion protein (GST), WT CHK1 sequence was cloned into the pGEX-4T2 vector. We generated CHK1 S280 mutated to Ala by using site directed mutagenesis with forward primer 5'-cgagtcactgcaggtgtgtgtcagagtcctcca-3' and reverse primer 5'-tgacacaccactgcagtgactcgggcttttgc-3'. Recombinant GST-CHK1 and GST-CHK1 S280A proteins, as well as the maltose binding protein-CDC25C recombinant protein were produced in bacteria, as previously described by Brezak et al. (2005).

HeLa cells were treated with CHK1 (SCH900776-500 nM) or PIM (SGI-1776-5 µM) inhibitors for 24 h, then cells were lysed in buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1% NP-40, 10 mM N-ethylmaleimide, protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) and phosphatase inhibitor cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich). The lysates were used for immunoprecipitation of PLK1 protein (mouse anti-PLK1, Cocktail, Invitrogen). Immunoprecipitates were washed three times with lysis buffer and subjected to *in vitro* kinases assay with NPM (Abcam, UK) or CDC25C (plasmid provided by Odile Mondésert, ITAV, Toulouse, France). Phosphorylation levels were monitored by immunoblotting using phospho-specific antibodies.

Quantitative PCR (qPCR)

Total RNA was extracted from U2OS cells transfected with control siRNA, siRNA targeting PIM1 and PIM2 or siRNA targeting CHK1, using the

RNeasy QIAGEN kit according to the manufacturer's instructions. RNA purity and concentration were monitored with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Thermo Fisher Scientific). cDNAs were synthesized from 1 µg total RNA using SuperScript III Reverse transcription (Invitrogen). Real-time qPCRs were performed on a StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) with a TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). The primer used was Hs01065498_m1 for *PIM1*, Hs00179139_m1 for *PIM2* and Hs00967506_m1 (Applied Biosystems) for *CHEK1*. *GUSB* (Hs00939627_m1) and *B2M* (Hs00984230_m1) were used as housekeeping genes. Results were analyzed with the StepOnePlus software v2.2.2 using the conventional $\Delta\Delta C_t$ method.

NanoLC-MS/MS analysis and database searches

After SDS-PAGE separation of the *in vitro* kinase reaction, the silver-stained corresponding band was in-gel digested with trypsin and analyzed by online LC-MS analysis.

CHK1 LC-MS analysis

The peptides digested from CHK1 were measured on an SCIEX 5600+ TripleTOF mass spectrometer operated in DDA mode. A Dionex Ultimate 3000 nanoLC HPLC system and a Hypersil GOLD 150×0.32 mm column (Thermo Fisher Scientific), packed with C18 3 µm 175 Å material were used for peptide separation. For the HPLC method, the buffer A used was 0.1% (v/v) formic acid, and the buffer B was 0.1% (v/v) formic acid, 90% (v/v) acetonitrile. The gradient was 4–45% buffer B in 24 min with a flow rate of 5 µl/min. For MS, a survey scan at the MS1 level (350–1600 *m/z*) was first carried out with 250 ms per scan. Then, the Top20 most intense precursors, whose charge states are 2–4 were fragmented. Signals exceeding 75 counts per second were selected for fragmentation and MS2 spectra generation. MS2 spectra were collected in the mass range 100–1600 *m/z* for 80 ms per scan. The dynamic exclusion time was set to 10 s.

LC-MS data analysis

To identify CHK1 peptides, profile-mode.wiff files from data acquisition were centroided and converted to mzML format using the AB Sciex Data Converter v.1.3 and submitted to Mascot (v.2.5) database searches against UniProt SwissProt human database. ESI-Quad-TOF was chosen as the instrument, trypsin/P as the enzyme and 2 missed cleavages were allowed. Peptide tolerances at MS and MS/MS level were set to be 20 ppm and 0.5 Da, respectively. Peptide variable modifications allowed during the search were oxidation of M and phosphorylation of STY. To calculate the false discovery rate (FDR), the search was performed using the 'decoy' option in Mascot.

Statistical analysis

At least three independent experiments were carried out to generate each dataset and statistical analyses were performed with the Student's *t*-test using the Prism software package (GraphPad Software). Results are expressed as means±s.e.m. Differences were considered significant for the following *P*-values: **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; *****P*<0.0001.

Acknowledgements

We thank Laetitia Ligat from the CRCT microscopy facility for helpful discussions on microscopy analyses. We gratefully acknowledge Dr Christine Dozier for critical review of the manuscript. The authors sincerely thank Romain Jugelé for his scientific contribution at the beginning of this project.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: L.Y., P.M., S.M., C.O.D.; Methodology: K.A., M.C., M.L., L.D., S.M., C.O.D.; Software: M.C., L.D., C.O.D.; Validation: K.A., M.C., M.L., L.D., C.O.D.; Formal analysis: K.A., M.C., L.D., S.M., C.O.D.; Investigation: M.C., M.L., L.D., P.M., S.M., C.O.D.; Resources: P.M., S.M.; Data curation: K.A., M.C., P.M., C.O.D.; Writing - original draft: K.A., P.M., S.M., C.O.D.; Writing - review & editing: M.C., A.B., P.M., S.M., C.O.D.; Visualization: S.M., C.O.D.; Supervision: P.M., S.M., C.O.D.; Funding acquisition: P.M., S.M.

Funding

This research was funded by the Ligue Contre le Cancer.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.213116.supplemental>

References

- Adam, K., Lambert, M., Lestang, E., Champenois, G., Dusanter-Fourt, I., Tamburini, J., Bouscary, D., Lacombe, C., Zermati, Y. and Mayeux, P. (2015). Control of Pim2 kinase stability and expression in transformed human haematopoietic cells. *Biosci. Rep.* **35**, e00274.
- Bhattacharya, N., Wang, Z., Davitt, C., McKenzie, I. F., Xing, P. X. and Magnuson, N. S. (2002). Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma* **111**, 80–95.
- Boles, N. C., Peddibhotla, S., Chen, A. J., Goodell, M. A. and Rosen, J. M. (2010). Chk1 haploinsufficiency results in anemia and defective erythropoiesis. *PLoS ONE* **5**, e8581.
- Brezak, M.-C., Quaranta, M., Contour-Galceran, M. O., Lavergne, O., Mondesert, O., Auvray, P., Kasprzyk, P. G., Prevost, G. P. and Ducommun, B. (2005). Inhibition of human tumor cell growth in vivo by an orally bioavailable inhibitor of CDC25 phosphatases. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1378–1387.
- Chilá, R., Celenza, C., Lupi, M., Damia, G. and Carrassa, L. (2013). Chk1-Mad2 interaction: a crosslink between the DNA damage checkpoint and the mitotic spindle checkpoint. *Cell Cycle* **12**, 1083–1090.
- David, L., Fernandez-Vidal, A., Bertoli, S., Grgurevic, S., Lepage, B., Deshaies, D., Prade, N., Cartel, M., Larrue, C., Sarry, J.-E. et al. (2016). CHK1 as a therapeutic target to bypass chemoresistance in AML. *Sci. Signal.* **9**, ra90.
- Enomoto, M., Goto, H., Tomono, Y., Kasahara, K., Tsujimura, K., Kiyono, T. and Inagaki, M. (2009). Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition. *J. Biol. Chem.* **284**, 34223–34230.
- Gheghiani, L., Loew, D., Lombard, B., Mansfeld, J. and Gavet, O. (2017). PLK1 activation in late G2 sets up commitment to mitosis. *Cell Rep.* **19**, 2060–2073.
- Guo, C., Kumagai, A., Schlacher, K., Shevchenko, A., Shevchenko, A. and Dunphy, W. G. (2015). Interaction of Chk1 with Treslin negatively regulates the initiation of chromosomal DNA replication. *Mol. Cell* **57**, 492–505.
- Hansen, D. V., Pomeroy, J. R., Summers, M. K., Miller, J. J., Ferrell, J. E., Jr and Jackson, P. K. (2007). Emi2 at the crossroads: where CSF meets MPF. *Cell Cycle* **6**, 732–738.
- Krämer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuåsen, R. G., Wilkinson, C. J., Nigg, E. A., Bartek, J. and Lukas, J. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat. Cell Biol.* **6**, 884–891.
- Lam, M. H., Liu, Q., Elledge, S. J. and Rosen, J. M. (2004). Chk1 is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell* **6**, 45–59.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuo, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Caratini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A. et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* **14**, 1448–1459.
- Li, P., Goto, H., Kasahara, K., Matsuyama, M., Wang, Z., Yatabe, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M. (2012). P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1582–1592.
- Macurek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M. A., Klomparek, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S. S., Yaffe, M. B. and Medema, R. H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* **455**, 119–123.
- Margottin-Goguet, F., Hsu, J. Y., Loktev, A., Hsieh, H. M., Reimann, J. D. and Jackson, P. K. (2003). Prophase destruction of Emi1 by the SCF(βTrCP/Slmb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev. Cell* **4**, 813–826.
- Morishita, D., Katayama, R., Sekimizu, K., Tsuruo, T. and Fujita, N. (2008). Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Res.* **68**, 5076–5085.
- Moshe, Y., Boulaire, J., Pagano, M. and Hershko, A. (2004). Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7937–7942.
- Peddibhotla, S., Lam, M. H., Gonzalez-Rimbau, M. and Rosen, J. M. (2009). The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 5159–5164.
- Petermann, E., Woodcock, M. and Helleday, T. (2010). Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 16090–16095.
- Petsalaki, E., Akoumianaki, T., Black, E. J., Gillespie, D. A. and Zachos, G. (2011). Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *J. Cell Biol.* **195**, 449–466.

- Puc, J., Keniry, M., Li, H. S., Pandita, T. K., Choudhury, A. D., Memeo, L., Mansukhani, M., Murty, V. V., Gaciong, Z., Meek, S. E. et al. (2005). Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell* **7**, 193-204.
- Renner, A. G., Dos Santos, C., Recher, C., Bailly, C., Créancier, L., Kruczynski, A., Payastre, B. and Manenti, S. (2009). Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells. *Blood* **114**, 659-662.
- Roh, M., Gary, B., Song, C., Said-Al-Naief, N., Tousson, A., Kraft, A., Eltoum, I. E. and Abdulkadir, S. A. (2003). Overexpression of the oncogenic kinase Pim-1 leads to genomic instability. *Cancer Res.* **63**, 8079-8084.
- Seki, A., Coppinger, J. A., Jang, C.-Y., Yates, J. R. and Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* **320**, 1655-1658.
- Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D. H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H. and Nakanishi, M. (2008). Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* **132**, 221-232.
- Strebhardt, K. (2010). Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 643-660.
- Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y. A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, M. and Nakayama, K. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev.* **14**, 1439-1447.
- Tamburini, J., Green, A. S., Bardet, V., Chapuis, N., Park, S., Willems, L., Uzunov, M., Ifrah, N., Dreyfus, F., Lacombe, C. et al. (2009). Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood* **114**, 1618-1627.
- Tang, J., Erikson, R. L. and Liu, X. (2006). Checkpoint kinase 1 (Chk1) is required for mitotic progression through negative regulation of polo-like kinase 1 (Plk1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11964-11969.
- Van der Meer, R., Song, H. Y., Park, S.-H., Abdulkadir, S. A. and Roh, M. (2014). RNAi screen identifies a synthetic lethal interaction between PIM1 overexpression and PLK1 inhibition. *Clin. Cancer Res.* **20**, 3211-3221.
- Walter, S. A., Cutler, R. E. Jr, Martinez, R., Gishizky, M. and Hill, R. J. (2003). Stk10, a new member of the polo-like kinase kinase family highly expressed in hematopoietic tissue. *J. Biol. Chem.* **278**, 18221-18228.
- Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Watanabe, N., Hunter, T. and Osada, H. (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4419-4424.
- Yuan, L. L., Green, A., Bertoli, S., Grimal, F., Mansat-De Mas, V., Dozier, C., Tamburini, J., Recher, C., Didier, C. and Manenti, S. (2014a). Pim kinases phosphorylate Chk1 and regulate its functions in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **28**, 293-301.
- Yuan, L. L., Green, A., David, L., Dozier, C., Recher, C., Didier, C., Tamburini, J. and Manenti, S. (2014b). Targeting CHK1 inhibits cell proliferation in FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **38**, 1342-1349.
- Zachos, G., Black, E. J., Walker, M., Scott, M. T., Vagnarelli, P., Earnshaw, W. C. and Gillespie, D. A. (2007). Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev. Cell* **12**, 247-260.
- Zhang, H., Shi, X., Paddon, H., Hampong, M., Dai, W. and Pelech, S. (2004). B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 35726-35734.

Supplementary Figure 1. Phosphorylation of CHK1 on S280 in mitosis. HeLa cells were transfected with siRNA control or targeting CHK1 according to the transfection procedures. After 24h transfection, cells were harvested for western-blot analysis (A) in order to validate CHK1 invalidation and to test the specificity of P-CHK1 antibody; or for immunofluorescence analysis (B), cells were co-stained with P-CHK1 antibody (green), anti-CHK1 antibody (orange) and DAPI (blue). (C) Tet-on HeLa cells were treated with or without 2 μ g/ml doxycycline (Dox) for 48h to express exogenous wild-type CHK1 or the S280A mutant to test the immunoreactivity of P-CHK1 antibody. (D) U2OS cells were synchronized by a double thymidine block (DTB), then released at different times. P-CHK1 and CHK1 levels were analyzed with the antibodies indicated. In parallel, cell cycle distribution after DTB synchronization was evaluated by FACS analyzes (right box). The asterisk (*) indicates a non-specific band. (E) Normal human fibroblast immortalized cells (the BJ hTERT cell line) were synchronized by double thymidine block, released into free medium and then harvested at the indicated times. Cell cycle progression after DBT synchronization is also presented in the insert on the right. (F) S280 phosphorylation status of CHK1 in mitotic extracts from control and nocodazole-treated BJ hTERT cells. (G) Cells death (trypan blue staining) were evaluated on nocodazole-treated cells and incubated with PIM, AKT and MEK inhibitors to the last 4 h treatment.

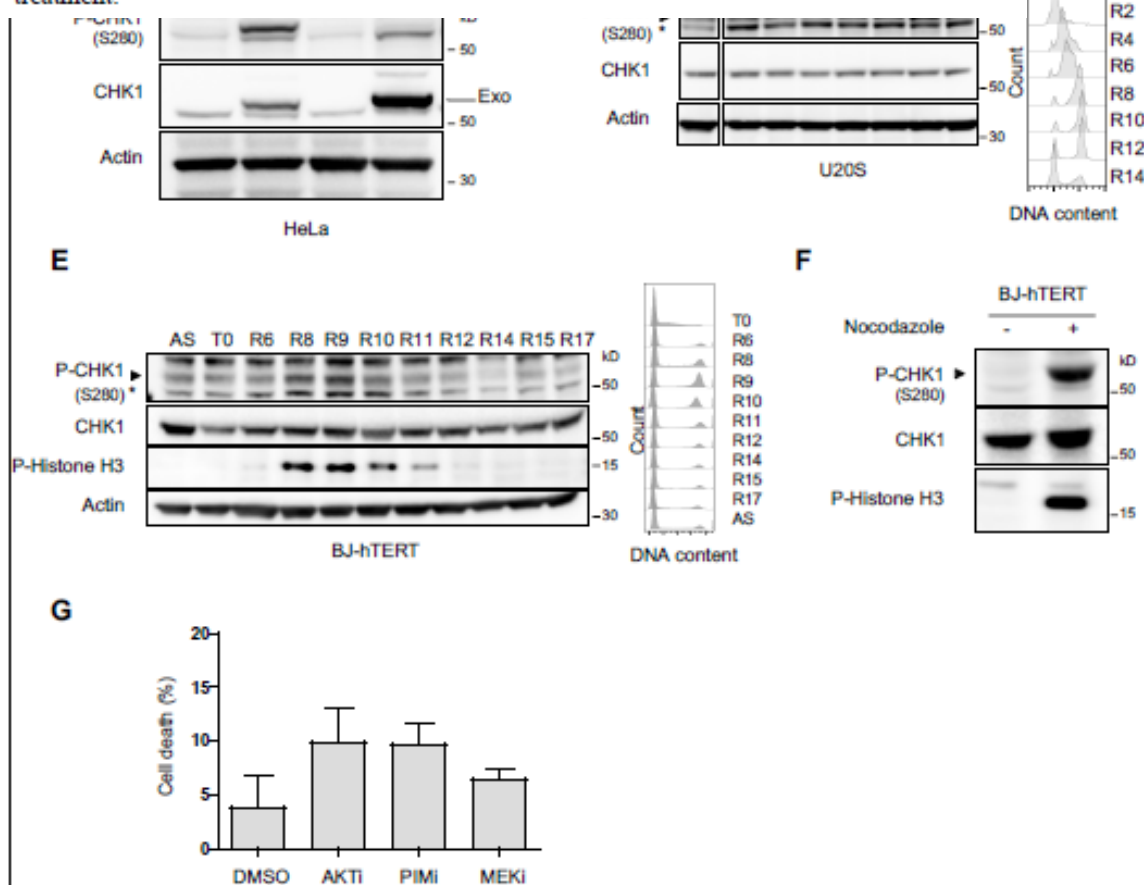
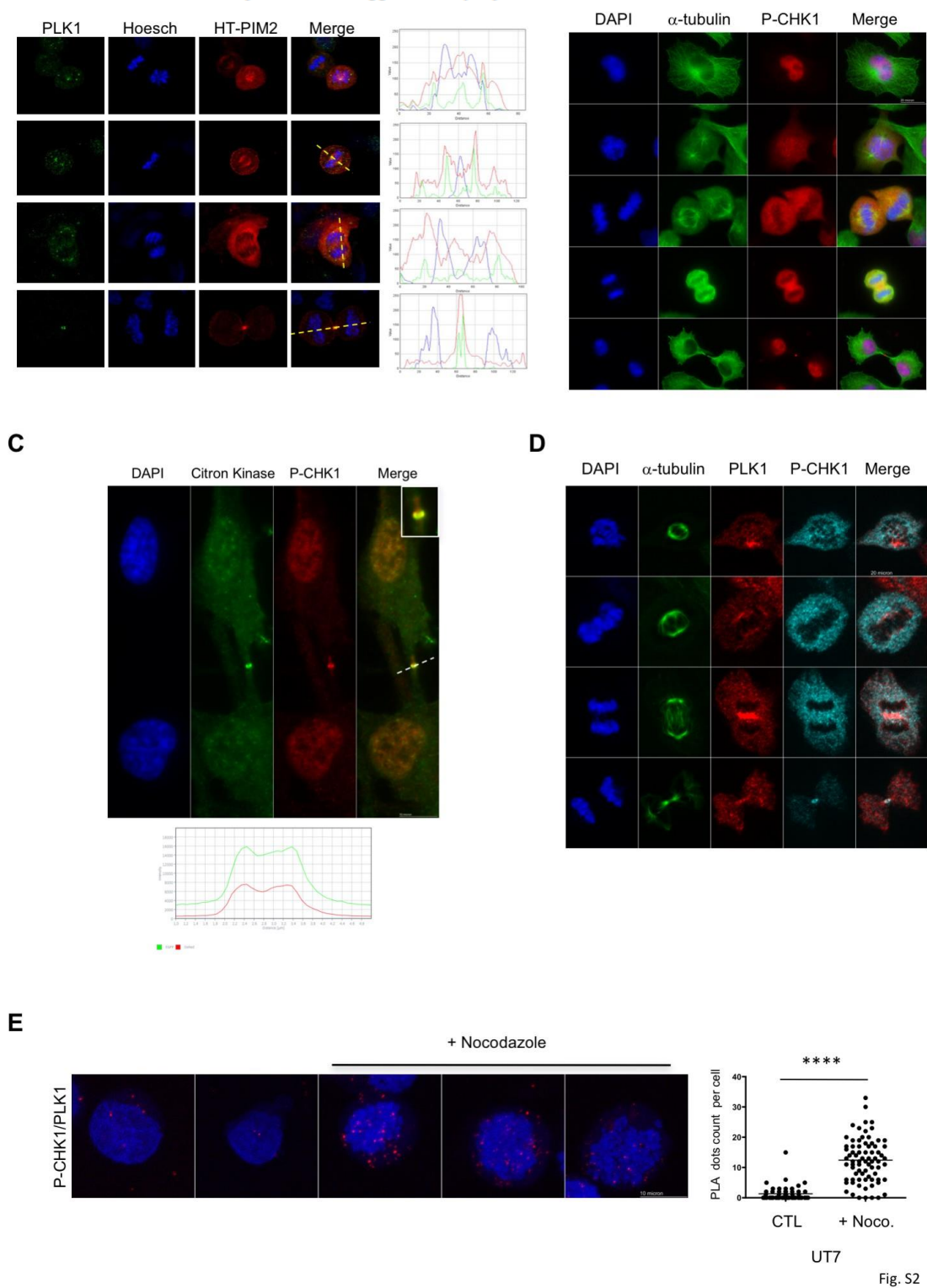
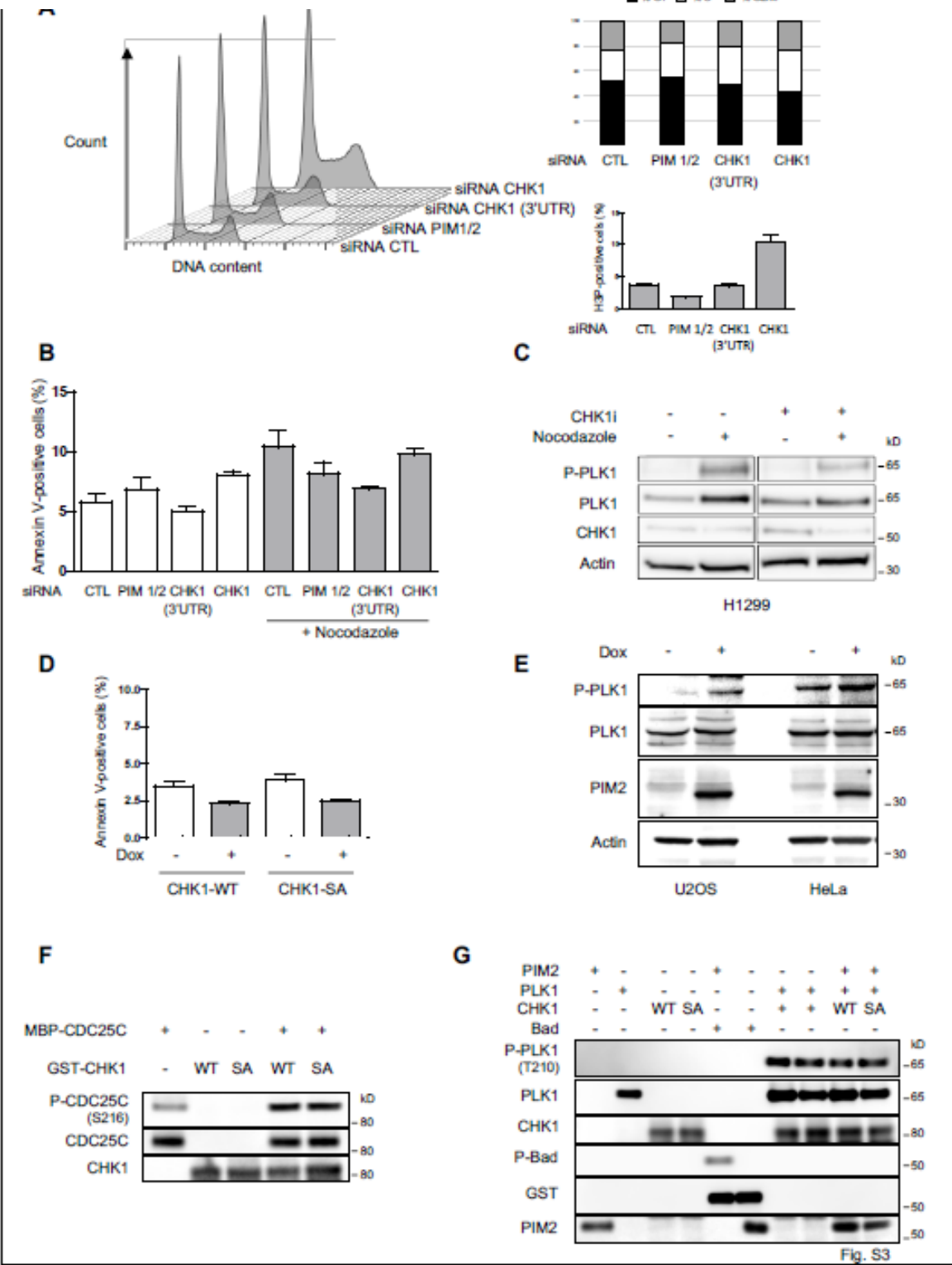


Fig. S1

J. Cell Sci. 131: doi:10.1242/jcs.213116: Supplementary information



Supplementary Figure 2. Localization of PIM2 and P-CHK1 during mitosis. (A) The HaloTag®-PIM2 fusion protein was revealed after 16h incubation using HaloTag® Fluorescent Ligand (red). Then, HeLa cells were fixed and stained for PLK1 (mitotic marker, green) and DNA (blue). (B) H1299 cells were stained with α -tubulin (green) and P-CHK1 S280 (red) antibodies, and DNA content was visualized by DAPI (blue). Scale bar = 20 μ m. The subcellular localization of these proteins was analyzed with ZEN and ImageJ software. (C) Co-staining of P-CHK1 (S280) and citron kinase in HeLa cells. (D) Confocal images of immunofluorescence staining for α -tubulin, PLK1 and P-CHK1 (S280) in HeLa cells. (E) Proximity ligation assays were performed using the P-CHK1/PLK1 antibodies in UT7 cells treated or not with 200 ng/mL nocodazole for 16h. DNA was stained with DAPI. Z-stack images were acquired by confocal microscopy and quantification of the images was performed with ZEN and ImageJ software. The distribution of foci per cell is presented (right box): mean=1.303 \pm 0.336 foci/cell from 53 nuclei analyzed under normal growing conditions, and mean=12.410 \pm 0.827 foci/cell in 76 nuclei analyzed following nocodazole treatment. P-values were determined using the non-parametric t-test, with $P \leq 0.0001$ (****).

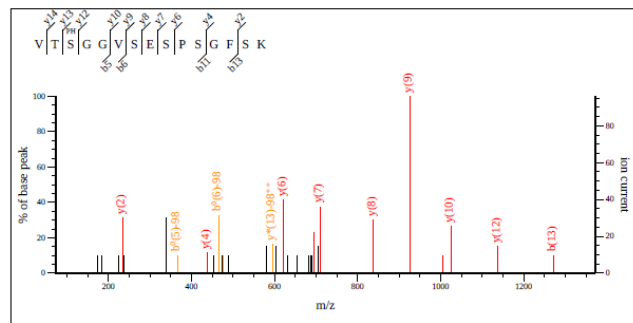


Supplementary Figure 3. PIM/CHK1 axis controls PLK1 phosphorylation during mitosis. (A) Cell cycle distribution (upper right) and mitotic status (bottom right) were simultaneously determined by propidium iodide staining and phospho-histone H3 (Ser10) labeling, analyzed by flow cytometry using a MACSQuant VYB flow cytometer (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) and FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR) (right panel) in cells transfected with control or CHK1 or CHK1 3'UTR or PIM1 and PIM2 siRNA. (B) Apoptosis was detected by co-staining with annexin V and cell viability dye in cells transfected and/or treated as indicated. (C) H1299 cells were treated with 500 nM CHK1 inhibitor (SCH900776), then synchronized in mitosis with 200 ng/mL nocodazole for 16h. PLK1 phosphorylation was analyzed by immunoblotting. (D) Impact of inducible overexpression of CHK1 wild type and mutant form on U2OS cell death evaluated by co-staining with Annexin V/cell viability dye (E) Impact of PIM2 expression on PLK1 phosphorylation, evaluated in U2OS and HeLa cell lines inducibly expressing PIM2 when treated with doxycycline (Dox, 2 μ g/mL). (G) *In vitro* kinase assay was performed with produced wild type and S280A mutant form of CHK1 and MBP-CDC25C, then phosphorylation of CDC25C (S216) was evaluated by immunoblot. (F) *In vitro* kinase assay was performed with PIM2 and PLK1 commercial recombinant proteins and produced wild type and S280A mutant form of CHK1, follow by western blot analyses of the level of PLK1 phosphorylation.

Supplementary Figure 4. Mass spectrometric identification of CHK1 phosphorylation at serine 280. (A) The MS/MS spectrum and table of the monophosphorylated peptide, 278-VTpSGGVSESPSGFSK-292 (doubly charged precursor ion, MH²⁺, at m/z 753.3321) displays series of y- and b-ions. Intense simply charged y13 (at m/z 1305.5359) together with simply charged y12 (at m/z 1138.5375) indicate that serine 280 is phosphorylated but not serine 284, serine 286 and serine 289, for the *in vitro* kinase assay with recombinant CHK1 protein. (B) MS/MS spectrum and table of the monophosphorylated peptide, 278-VTpSGGVSESPSGFSK-292 (doubly charged precursor ion, MH²⁺, at m/z 753.3310) for *in vitro* kinase assay with recombinant CHK1 and PIM2 proteins. Intense simply charged y12 (at m/z 1138.5375) indicates that phosphorylation can only be located on serine 280 or threonine 279. The ions at m/z 604.2779 and m/z 595.7698, are likely to be the doubly charged y13 and y13-NH₃-H₃PO₄ which is in favor of the phosphorylation of serine280. Mascot site analysis found a probability to be phosphorylated of 62.99% and 36.92% for serine 280 and threonine 279 respectively. The Mascot expectation value for the peptide match (the number of times we would expect to obtain an equal or higher score, purely by chance) was 2e-05 for the *in vitro* kinase assay with recombinant CHK1 and PIM2 proteins and 8.3e-08 for the *in vitro* kinase assay with recombinant CHK1 protein.

#	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#				
13	1272.5144	636.7608	1254.5038	627.7555	F	381.2132	191.1103	364.1867	182.5970	363.2027	182.1050	3
14	1359.5464	680.2768	1341.5359	671.2716	S	234.1448	117.5761	217.1183	109.0628	216.1343	108.5708	2
15					K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468			1

B



#	b	b ⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	100.0757	50.5415			V							15
2	201.1234	101.0653	183.1128	92.0600	T	1308.6066	654.8070	1291.5801	646.2937	1290.5961	645.8017	14
3	270.1448	135.5761	252.1343	126.5708	S	1207.5590	604.2831	1190.5324	595.7698	1189.5484	595.2778	13
4	327.1663	164.0868	309.1557	155.0815	G	1138.5375	569.7724	1121.5109	561.2591	1120.5269	560.7671	12
5	384.1878	192.5975	366.1772	183.5922	G	1081.5160	541.2617	1064.4895	532.7484	1063.5055	532.2564	11
6	483.2562	242.1317	465.2456	233.1264	V	1024.4946	512.7509	1007.4680	504.2376	1006.4840	503.7456	10
7	570.2882	285.6477	552.2776	276.6425	S	925.4262	463.2167	908.3996	454.7034	907.4156	454.2114	9
8	699.3308	350.1690	681.3202	341.1638	E	838.3941	419.7007	821.3676	411.1874	820.3836	410.6954	8
9	786.3628	393.6850	768.3523	384.6798	S	709.3515	355.1794	692.3250	346.6661	691.3410	346.1741	7
10	883.4156	442.2114	865.4050	433.2061	P	622.3195	311.6634	605.2930	303.1501	604.3089	302.6581	6
11	970.4476	485.7274	952.4370	476.7222	S	525.2667	263.1370	508.2402	254.6237	507.2562	254.1317	5
12	1027.4691	514.2382	1009.4585	505.2329	G	438.2347	219.6210	421.2082	211.1077	420.2241	210.6157	4
13	1174.5375	587.7724	1156.5269	578.7671	F	381.2132	191.1103	364.1867	182.5970	363.2027	182.1050	3
14	1261.5695	631.2884	1243.5590	622.2831	S	234.1448	117.5761	217.1183	109.0628	216.1343	108.5708	2
15					K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468			1

Fig. S4

III. Discussion

Bien que des études montrent des fonctions de CHK1 au cours de la mitose, indépendamment de la réponse aux dommages de l'ADN (Krämer et al., 2004 - Schmitt et al., 2006 - Tang et al., 2006 - Peddibhotla et al., 2009 - Yang et al., 2014), de nombreuses questions persistent quant aux mécanismes précis et l'identités des cibles moléculaires régulées par CHK1. Dans ce travail, nous démontrons une toute nouvelle régulation ainsi qu'un nouveau rôle de CHK1 au cours de la mitose, en mettant en lumière une nouvelle cascade de phosphorylation impliquant les kinases PIM/CHK1/PLK1.

En effet, nous montrons tout d'abord que CHK1 phosphoryle directement PLK1 sur le résidu T210, régulant ainsi positivement l'activité de PLK1 au cours de la mitose. Précédemment, une étude réalisée par Tang et ses collaborateurs suggérait déjà un lien entre PLK1 et CHK1 au cours de la mitose, où CHK1 régule négativement PLK1 pour inactiver le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique et permettre la progression de la mitose (Tang et al., 2006). Lors de ces travaux, aucune évidence d'une interaction entre CHK1 et PLK1 ou d'un site de phosphorylation potentiel n'était apportée. Dans notre étude, nous montrons pour la première fois que CHK1 et PLK1 interagissent au cours de la mitose, et que CHK1 phosphoryle PLK1 sur le résidu T210, régulant son

activation. Lors de précédentes études, la T210 de PLK1 a déjà été identifiée comme phosphorylée au cours de la mitose par les kinases STK10, SLK et Aurora A, permettant son activation (Walter et al., 2003 - Macurek et al., 2008 – Seki et al., 2008). Au vu de ces études et du nouveau rôle de CHK1 dans cette phosphorylation, il serait maintenant nécessaire de définir comment ces kinases se coordonnent pour phosphoryler et activer PLK1. De plus, il serait intéressant de déterminer si CHK1 phosphoryle PLK1 sur un autre résidu permettant de réprimer son activité, comme montré dans les travaux précédents de Tang et ses collaborateurs, et d'identifier comment et dans quel contexte CHK1 est capable de réguler positivement ou négativement PLK1.

Bien que l'activation de CHK1 soit essentiellement décrite comme dépendante des phosphorylations en S345 et S317 par ATR (Toledo et al., 2011), plusieurs études mettent en évidence que CHK1 peut phosphoryler ses substrats indépendamment d'une activation par ATR. En effet, plusieurs études décrivent les phosphorylations de CHK1 sur les résidus sérines 286 et 301 (Enomoto et al., 2009), ou encore très récemment sur les thréonines 378 et 382 (Gong et al., 2015 – Emptage et al., 2017 – Gong et al., 2018), comme impliquées dans l'activation de CHK1 indépendamment de la voie de dommages. Une littérature plus riche décrit également la phosphorylation de CHK1 sur la sérine 280, par les kinases AKT et p90RSK, modulant sa localisation subcellulaire (Puc et al., 2005 – Li et al., 2012), et par les kinases PIM1 et PIM2 stimulant la prolifération des cellules leucémiques (Yuan et al., 2014b). Afin de mieux comprendre comment CHK1 phosphorylée sur la sérine 280 peut réguler la prolifération cellulaire, nous avons étudié l'expression de cette forme de CHK1 au cours du cycle. Dans ce travail, nous montrons que la phosphorylation de CHK1 en sérine 280 est dépendante du cycle cellulaire, et que CHK1 S280 est majoritairement phosphorylée pendant la mitose. Cette phosphorylation est en partie dépendante de la kinase PIM2, et est nécessaire pour permettre la phosphorylation activatrice de PLK1 par CHK1. Bien que la régulation et les effets de cette phosphorylation de CHK1 par les différentes kinases AKT, p90RSK et PIM restent à être clarifiés, grâce à ce travail nous apportons de nouvelles informations quant à la régulation de CHK1 sur ce résidu S280, ainsi que son importance dans les fonctions de CHK1 au cours de la mitose.

Au-delà d'une meilleure connaissance de l'implication de CHK1 au cours de la mitose d'un point de vue fondamental, nos travaux présentent également un réel intérêt dans un contexte clinique, notamment dans des pathologies hématopoïétiques. En effet, plusieurs études impliquent indépendamment les kinases PIM2, CHK1 et PLK1 dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes. Dans un premier temps, la kinase PIM2 a été retrouvée surexprimée dans des échantillons de patients atteints de LAM, en comparaison à des CD34+ obtenus de patients sains (Tamburini et al., 2009). PIM2, en phosphorylant 4E-BP1, serait capable de réguler la transcription dans les cellules leucémiques. Ainsi, une surexpression de PIM2 conduirait à une dérégulation de la synthèse protéique dans les LAM, et l'inhibition de cette kinase pourrait être considérée comme une cible d'intérêt. Plus récemment, l'importance de PIM2 dans les LAM a de nouveau été étudiée, et des résultats montrent que PIM2 joue

un rôle important la survie des cellules de LAM portant la mutation FLT3-ITD en régulant l'expression de Bax et de la kinase RSK2 (Hospital et al., 2018). Dans une autre étude effectuée dans les LAM, PLK1 a été retrouvée fréquemment surexprimée, et l'inhibition pharmacologique (BI2536) ou l'invalidation par siARN de cette kinase permet de bloquer la prolifération des lignées cellulaires et des cellules primaires de LAM (Renner et al., 2009). Enfin, comme présenté dans la première partie de cette thèse, des travaux de mon équipe ont mis en évidence que CHK1 est retrouvée exprimée de manière hétérogène dans les LAM, et qu'un fort niveau de CHK1 se révèle être un marqueur de mauvais pronostic et de résistance dans cette pathologie (David et al., 2016). De plus, des travaux de l'équipe ont précédemment démontré que CHK1 peut être phosphorylée sur le résidu S280 par PIM2 dans les cellules de LAM, et que ceci stimulait la prolifération cellulaire (Yuan et al., 2014b). L'ensemble des acteurs de la voie de régulation décrite dans notre article sont retrouvés fortement exprimés dans les LAM, et pourraient devenir un axe thérapeutique intéressant dans cette pathologie. En effet, au vu de l'importance de l'axe PIM/CHK1/PLK1 dans la progression de la mitose, une forte expression des acteurs de cette voie pourrait être responsable d'une prolifération accrue des cellules, comme il est justement le cas pour les cellules de LAM. Ainsi, cibler cet axe PIM/CHK1/PLK1 dans les LAM pourrait réduire la prolifération des cellules leucémiques et induire leur mort cellulaire, comme montré dans l'article de Renner et ses collaborateurs en inhibant PLK1 (Renner et al., 2009). Des essais cliniques sont actuellement en cours, notamment dans les LAM, en utilisant des inhibiteurs de PLK1 seul ou en association avec de faibles doses de cytarabine, et confortent donc notre hypothèse de l'intérêt du ciblage de cet axe (données disponibles en ligne sur Clinical Trial, page consultée le 07/10/2019 : <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=PLK1&term=&cntry=&state=&city=&dist=>).

Ainsi, pour confirmer cette hypothèse, il serait indispensable de (i) confirmer les résultats obtenus dans cette étude, en utilisant un modèle de LAM pour déterminer si CHK1, préalablement phosphorylée en S280 par PIM 2, est capable d'activer PLK1, et (ii) de déterminer si inhiber cet axe peut devenir une stratégie thérapeutique d'intérêt, notamment dans les LAM.

Bien que certaines questions restent à clarifier, l'ensemble de ce travail apporte de nouvelles connaissances sur la régulation et le rôle de CHK1 dans le bon déroulement de la mitose. De plus, l'identification de cette nouvelle cascade de phosphorylation ouvre de nouveaux axes de recherche, notamment d'identifier l'intérêt potentiel du ciblage de cet axe dans les LAM.

Partie 3 : Rôle de CHK1 dans la différenciation mégacaryocytaire

I. Contexte scientifique et résultats préliminaires

L'ensemble des données de la littérature actuelle mettent en évidence que CHK1 est une protéine essentielle au bon déroulement de l'hématopoïèse normale (Carrassa et al., 2010 - Rahmani et al., 2002 - Zaugg et al., 2007 - Boles et al., 2010 - Schuler et al., 2017 - Schuler et al., 2019). En particulier, l'article publié par Boles et ses collaborateurs a intéressé mon équipe d'accueil car, dans leurs travaux, les auteurs indiquent que des souris hétérozygotes pour CHK1 présentent une diminution du nombre de plaquettes circulantes, mais ce résultat n'est pas commenté par les auteurs (Boles et al., 2010). Ceci a amené l'équipe à émettre l'hypothèse que CHK1 pourrait intervenir au cours de la différenciation mégacaryocytaire et dans la formation des plaquettes.

Laure David, une doctorante ayant effectué sa thèse au laboratoire avant mon arrivée, a travaillé sur ce projet, et a mis en évidence que CHK1 est en effet impliquée dans la différenciation mégacaryocytaire. En utilisant dans un premier temps la lignée cellulaire leucémique HEL, ayant la capacité de se différencier dans le lignage mégacaryocytaire sous stimulation au Phorbol Myristate Acetate (PMA), Laure a montré que l'inactivation de CHK1 par shARN dans ces cellules conduit à un blocage partiel de la différenciation. En effet, après 72 h de stimulation de ces cellules au PMA et de transduction du shARN dirigé contre CHK1, une diminution significative du nombre de cellules ayant un contenu en

ADN de 32N est observée (Figure 60A et B), ainsi qu'une diminution d'expression du marqueur des cellules engagées dans la voie mégacaryocytaire CD61 (Figure 60C). Afin de confirmer ces résultats dans un système plus physiologique que des cellules leucémiques HEL, des progéniteurs murins ont été purifiés à partir des os longs des pattes de souris. Ces cellules ont été traitées pendant 3 jours à la Thrombopoïétine (TPO), permettant l'induction de la différenciation mégacaryocytaire, seule ou avec l'inhibiteur de CHK1 (SCH900776). Après ce traitement, l'analyse de la polyploïdisation de ces cellules par cytométrie de flux a été effectuée et révèle que l'inhibition de CHK1 réduit là encore de manière significative le nombre de cellules ayant un contenu en ADN supérieur à 32N (Figure 60D et E). En parallèle, l'analyse de deux marqueurs de surface spécifiques au lignage mégacaryocytaire, CD42b et GPVI, nous permet de voir une diminution du nombre de cellules positives pour ces deux marqueurs (Figure 60F et G).

Ensemble, ces résultats mettent en lumière l'importance de CHK1 pour le bon déroulement du processus de différenciation mégacaryocytaire, tant dans des lignées cellulaires que dans un modèle de cellules primaires murines.

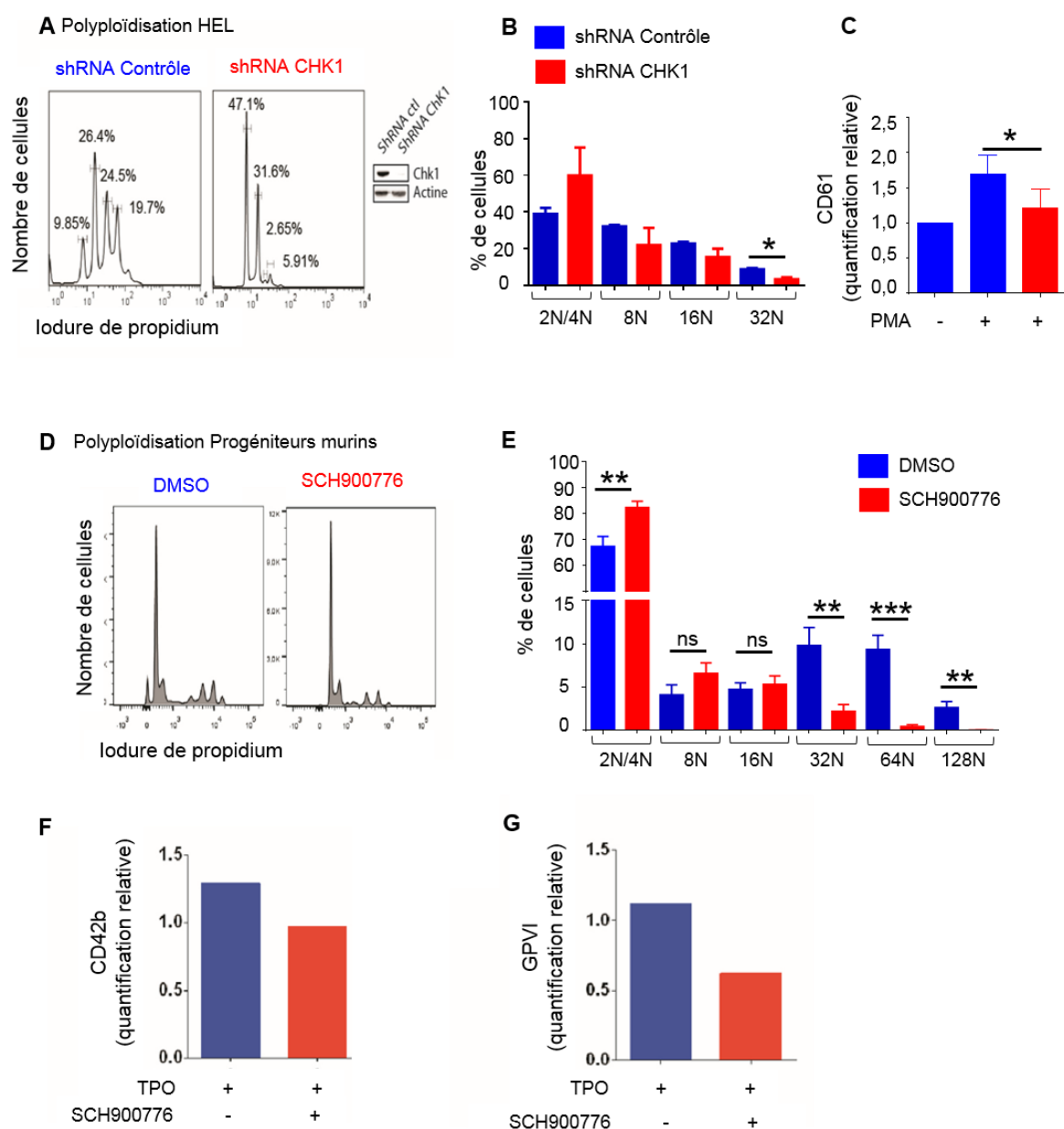


Figure 60 : CHK1 est impliquée dans la différenciation mégacaryocytaire, analysée à l'aide de la lignée modèle leucémique HEL et de progéniteurs mégacaryocytaires murins. **A** : Analyse de la polyplôidisation par un marquage à l'iodure de propidium dans les cellules HEL transduites par un shARN contrôle ou dirigé contre CHK1 puis traitées à la PMA (3 nM) pendant 3 jours. Un western blot de l'inactivation de CHK1 est présenté. **B** : Quantification de la polyplôidisation sur 3 expériences indépendantes comme présenté en A. **C** : Analyse du marqueur de surface CD61 dans la lignée HEL après 72h de traitement au PMA, dans 5 expériences indépendantes. **D** : Analyse de la polyplôidisation par un marquage à l'iodure de propidium dans des progéniteurs mégacaryocytaires murins traités pendant 72 h à la TPO (50 ng/mL) avec ou sans inhibiteur de CHK1 (SCH900776 à 500 nM). **E** : Quantification de la polyplôidisation sur 9 expériences indépendantes comme présenté en D. **F-G** : Analyse du marqueur de surface CD42b (F) et GPVI (G) dans les progéniteurs mégacaryocytaires murins après 72 h de traitement à la TPO, dans 1 seule expérience.

Suite à ces résultats, la question du statut de phosphorylation de la kinase CHK1 dans ce processus de différenciation s'est posée. Laure David a pu déterminer que le niveau de phosphorylation de CHK1 sur les résidus sérine 317 et 345 n'était pas modifié après induction de la différenciation des cellules HEL par traitement au PMA, mais que la phosphorylation sur le résidu sérine 280 augmentait fortement, dès 30 minutes après l'induction de la différenciation (Figure 61A). Cette augmentation de la phosphorylation est également retrouvée dans les progéniteurs murins stimulés à la TPO (Figure 61B), et ses expériences ont permis de mettre en évidence que cette phosphorylation en sérine 280 était majoritairement effectuée par les kinases PIM et RSK (Figure 61C).

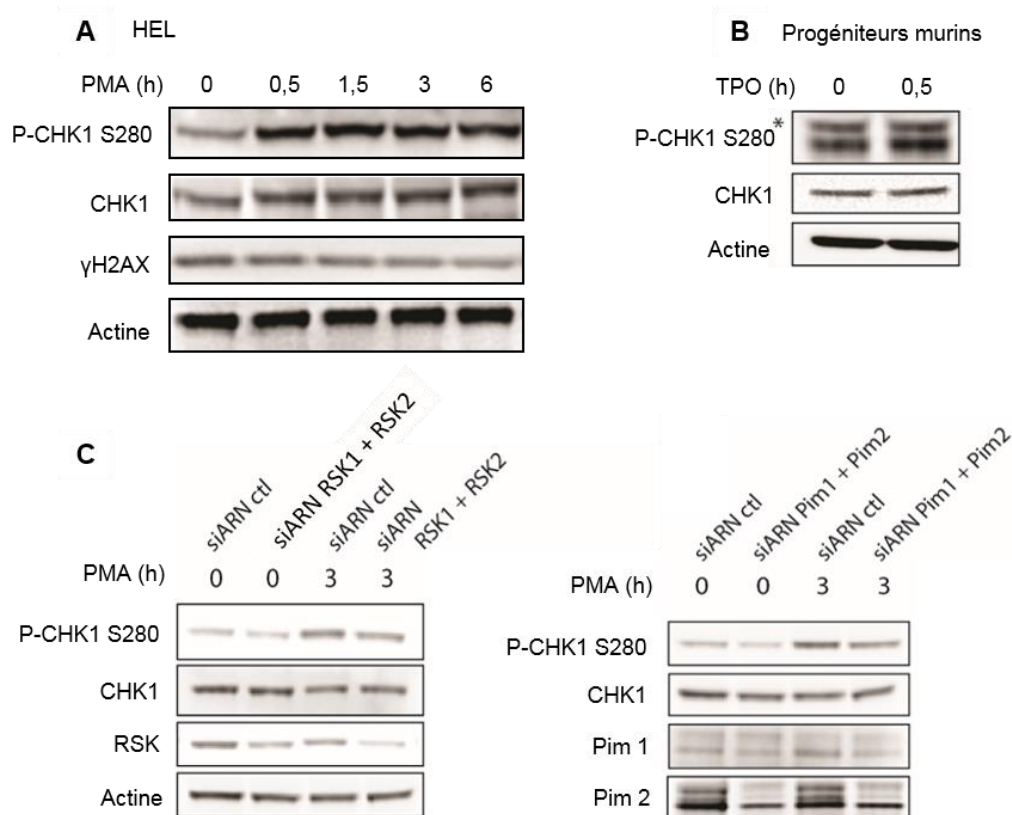


Figure 61 : CHK1 est phosphorylée précocement sur le résidu sérine 280 au cours de la différenciation mégacaryocytaire par les kinases PIM et RSK. **A** : Cinétique d'expression protéique de CHK1 et de son niveau de phosphorylation de la sérine 280 au cours de la différenciation induite par un traitement au PMA (3 nM) sur la lignée HEL (n=5). **B** : Expression protéique de CHK1 et de son niveau de phosphorylation de la sérine 280 au cours de la différenciation induite par un traitement à la TPO (50 ng/mL) sur les progéniteurs mégacaryocytaires murins (n=3) **C** : invalidation par siARN dirigé contre les kinases RSK (panel de gauche) et les kinase PIM (panel de droite) pour déterminer l'impact sur la phosphorylation de CHK1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire induite par un traitement au PMA (3 nM) dans les cellules HEL.

Laure David s'est ensuite intéressée à l'identification de partenaires possibles de CHK1 au cours de ce processus de différenciation mégacaryocytaire. Ainsi, une immunoprécipitation de CHK1 a été effectuée à partir de cellules HEL traitées ou non à la PMA, puis l'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée par la plateforme de protéomique de l'institut Cochin dirigée par le Pr. Patrick Mayeux. Afin d'assurer une spécificité de l'immunoprécipitation, une condition où CHK1 est invalidée a été effectuée. Suite à l'analyse par spectrométrie de masse, 123 protéines ont été retrouvées de manière spécifique dans la fraction de CHK1 immunoprécipitée. Parmi ces protéines, certaines ont particulièrement retenu l'attention de l'équipe, en étant impliquées dans la transcription et la progression en mitose, qui sont des étapes clés de la polyploïdisation, nous laissant envisager un rôle de ces protéines dans ce processus de différenciation. De plus, des protéines directement impliquées dans la différenciation mégacaryocytaire ont été retrouvées immunoprécipitées avec CHK1, notamment les facteurs de transcription largement décrits dans cette différenciation que sont ETV3/6, GATA2 et NF-E2.

Suite aux résultats préliminaires obtenus par Laure David, j'ai participé à la caractérisation du rôle de la protéine CHK1 dans la différenciation mégacaryocytaire. Pour poursuivre ces premières études effectuées sur des progéniteurs mégacaryocytaires murins, nous avons utilisé des souris hétérozygotes pour CHK1, dans le but de mieux définir l'importance de CHK1 dans la différenciation mégacaryocytaire. De plus, des études *in vitro* ont été réalisées afin de déterminer si le rôle de CHK1 implique un des facteurs de transcription retrouvé dans l'étude protéomique. Ce travail a été réalisé avec Christine Didier, mon encadrante, et Camille Hamelle, que j'ai pu co-encadrer pendant son stage de Master 2 réalisé dans l'équipe. De plus, le travail *in vivo* s'est effectué grâce à deux étroites collaborations, d'une part avec Sonia Séverin, chercheuse au sein de l'équipe dirigée par le Pr. Bernard Payrastre à l'Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires à Toulouse, et d'autre part avec Bastien Gerby et Vincent Fregona, respectivement chercheur et étudiant en thèse au sein de l'équipe dirigée par le Pr. Eric Delabesse au Centre de Recherche de Cancérologie de Toulouse.

II. Matériels et méthodes

1. [Modèle cellulaire de différenciation mégacaryocytaire](#)

L'étude de la différenciation mégacaryocytaire a été effectuée sur la lignée leucémique HEL capable de se différencier dans le lignage mégacaryocytaire sous stimulation au Phorbol Myristate Acetate (PMA) à 3 nM pendant 3 jours.

Des cellules murines ont également été extraites de la moelle osseuse des os long des pattes arrières (fémur et tibia) de souris C57BL/6 sauvages et de souris C57BL/6 hétérozygotes pour CHK1. L'enrichissement des cellules extraites en progéniteurs mégacaryocytaires s'effectue par lyse des érythrocytes et une sélection négative grâce à des anticorps dirigés contre des protéines de surface spécifiques aux macrophages, monocytes, lymphocytes B, granulocytes et natural killer (Gr-1, B220, CD16/32, CD11b). Après cette étape de sélection négative, les cellules résiduelles sont majoritairement des progéniteurs mégacaryocytaires, qui sont cultivés *in vitro* dans du milieu StemPro complet. Ces cellules peuvent être induites en différenciation par un traitement à la TPO à 50 ng/mL pendant 4 jours.

2. [Evaluation de la différenciation mégacaryocytaire](#)

La progression de la différenciation mégacaryocytaire a été évaluée en mesurant la polyploïdisation des cellules, reflétant l'état de maturation nucléaire. Pour cela, les progéniteurs murins ont été récupérés après 3 jours de traitement à la TPO, puis les mégacaryocytes ont été séparés grâce à un gradient de BSA (1 à 3%) permettant de discriminer les cellules grâce à leur poids. Les cellules les plus lourdes étant les mégacaryocytes, le bas du gradient est récupéré après 45min de sédimentation. Ces cellules sont ensuite fixées avec de la PFA 0.5% et marquées avec de l'iodure de propidium, pour être analysées par cytométrie de flux.

3. [Souris hétérozygotes pour CHK1](#)

Les embryons congelés de souris sauvages ou hétérozygotes pour CHK1 C57BL/6 (Souche : STOCK Chek1tm1Sany/Mmucd) ont été obtenus auprès de la compagnie « Mutant Mouse Resource and Research Centers, MMRRC » aux Etats Unis et la procédure de reviviscence des embryons a été effectuée par la compagnie. Des croisements ont ensuite été effectués pour obtenir une cohorte de souris CHK1+/+ et CHK1+/- . Le génotypage a été effectué par PCR sur un morceau d'oreille des souris.

4. [Transplantation des souris](#)

Les cellules souches Lin- Sca1+ c-Kit+ (LSK) capables de reconstituer l'ensemble des progéniteurs et cellules hématopoïétiques, ont été purifiées à partir de la moelle osseuse de souris C57BL/6 sauvages (WT) et de souris C57BL/6 hétérozygotes (HT) pour CHK1 (CD45.1), âgées de 16 semaines. Ces cellules ont ensuite été transplantées en intraveineuse dans des souris receveuses C57BL/6 (CD45.2) âgées de 6 à 8 semaines, prétraitées 24 h avant la transplantation par du busulfan (30 mg/kg). L'analyse du chimérisme des souris, révélant l'efficacité d'envahissement de la moelle et de différenciation des cellules injectées, a été effectuée par cytométrie de flux et est représentée par le pourcentage de cellules donneuses (CD45.1) retrouvées dans la moelle osseuse des souris receveuses (CD45.2).

III. Résultats

Afin de poursuivre l'étude initiée par Laure David sur l'importance de CHK1 dans la différenciation mégacaryocytaire *in vitro* sur la lignée leucémique HEL et les progéniteurs murins, un modèle de souris hétérozygote pour CHK1 a été acquis par l'équipe, comme celui utilisé dans l'article princeps publié par Boles et ses collaborateurs (Boles et al., 2010). A l'aide de ce modèle, nous souhaitons évaluer l'impact du niveau d'expression protéique de CHK1 sur la mégacaryopoïèse, et pouvoir travailler sur des échantillons primaires sauvages ou hétérozygotes pour CHK1.

Pour commencer, une analyse par PCR a été effectuée afin de génotyper les souris et s'assurer que les souris hétérozygotes pour CHK1 présentaient bien moitié moins d'ARNm de CHK1 (Figure 62A). En collaboration avec Sonia Séverin à l'I2MC, des analyses sanguines ont ensuite été effectuées sur ces souris sauvages (WT) ou hétérozygotes (HT) pour CHK1, afin d'étudier le nombre (Figure 62B) et la taille (Figure 62C) des plaquettes, afin de confirmer les résultats décrits par Boles et ses collaborateurs sur la diminution du nombre de plaquettes dans les souris hétérozygotes pour CHK1 (Boles et al., 2010). Contrairement aux résultats présentés dans l'article de Boles sur des souris âgées de 52 semaines, aucune différence sur le nombre ou la taille des plaquettes n'est visible sur nos souris hétérozygotes, âgées de 8 à 16 semaines, tout sexe confondu. Suite à ce résultat, nous avons souhaité évaluer le niveau protéique de CHK1 dans des échantillons primaires de ces souris WT ou HT âgées de 12 ou 19 semaines. De manière très surprenante, aucune différence du niveau protéique de CHK1 n'est observée entre les souris sauvages ou hétérozygotes, dans la moelle ou dans d'autres organes étudiés (Figure 62D et E), bien que ces souris présentent moitié moins d'ARNm de CHK1 (Figure 62A). Au vu de ces premiers résultats, il semblerait, à ce stade, que CHK1 soit régulée indépendamment du niveau de son ARNm présent dans les cellules.

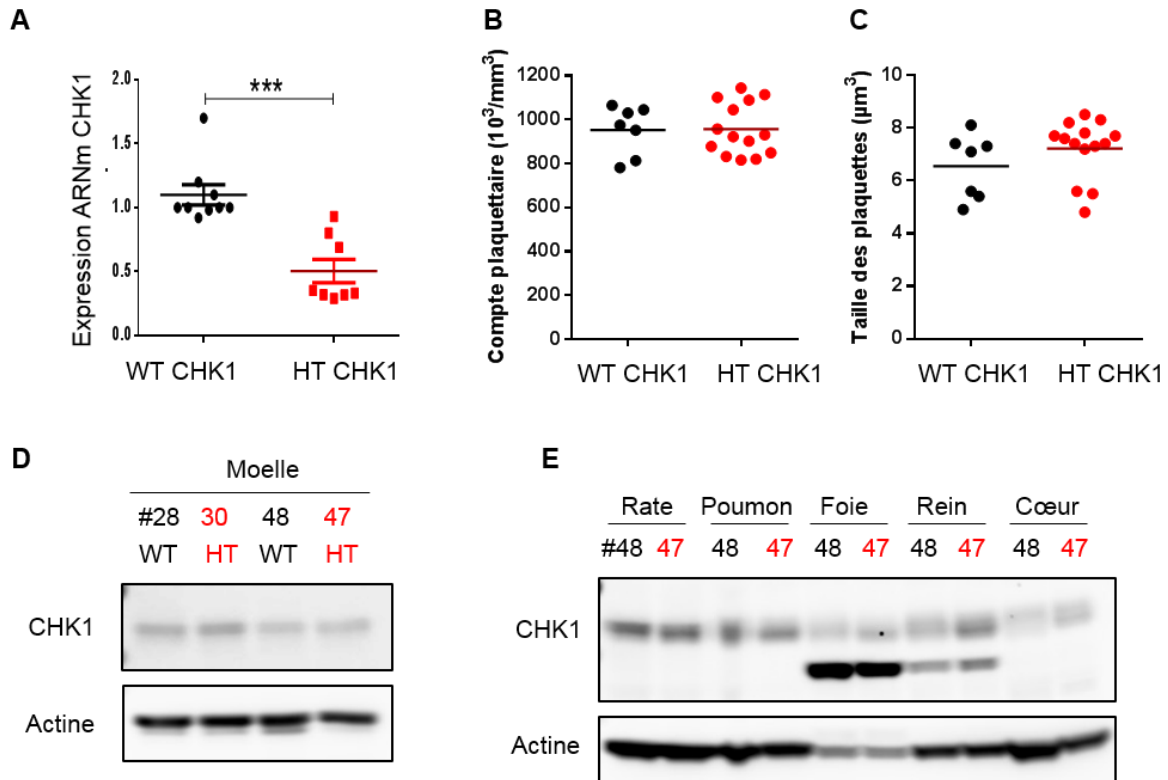


Figure 62 : Etude de l'impact de l'haplo-insuffisance de CHK1 chez des souris jeunes. **A** : Etude du niveau d'expression de l'ARNm de CHK1 dans des progéniteurs murins purifiés à partir de souris sauvages (WT n=9) ou hétérozygotes (HT n=8) pour CHK1, âgées de 2 à 6 mois, femelles et mâles confondus. Moyenne d'expression de l'ARNm de CHK1 chez les souris sauvages = 1,1 ; et chez les souris hétérozygotes = 0,5. **B-C** : Comptage plaquettaire (B) et évaluation de leur taille (C) chez des souris sauvages (WT n=7) ou hétérozygotes (HT n=14) âgées de 8 à 16 semaines, femelles et mâles confondus. **D-E** : Evaluation par western blot du niveau protéique de CHK1 dans des échantillons primaires de souris sauvages (WT) ou hétérozygotes (HT) pour CHK1, âgées de 12 semaines (#48 et 47) et de 19 semaines (#28 et 30) dans la moelle (D) ou dans d'autres organes (E).

Au vu de ces premiers résultats, et compte tenu du fait que les résultats de Boles ont été obtenus sur des souris âgées de 52 semaines, nous nous sommes demandés si l'âge pouvait jouer un rôle important dans les effets observés. Ainsi, nous avons réévalué le niveau protéique de CHK1 dans plusieurs organes obtenus de ces souris sauvages ou hétérozygotes pour CHK1, âgées cette fois de 24 semaines (6 mois). Dans tous les échantillons étudiés pour les souris HT pour CHK1, un très faible niveau protéique de CHK1 est retrouvé en comparaison aux souris sauvages (Figure 63A). De manière intéressante, la perte d'un allèle de CHK1 induit une diminution de son niveau protéique plus importante qu'une perte de 50%.

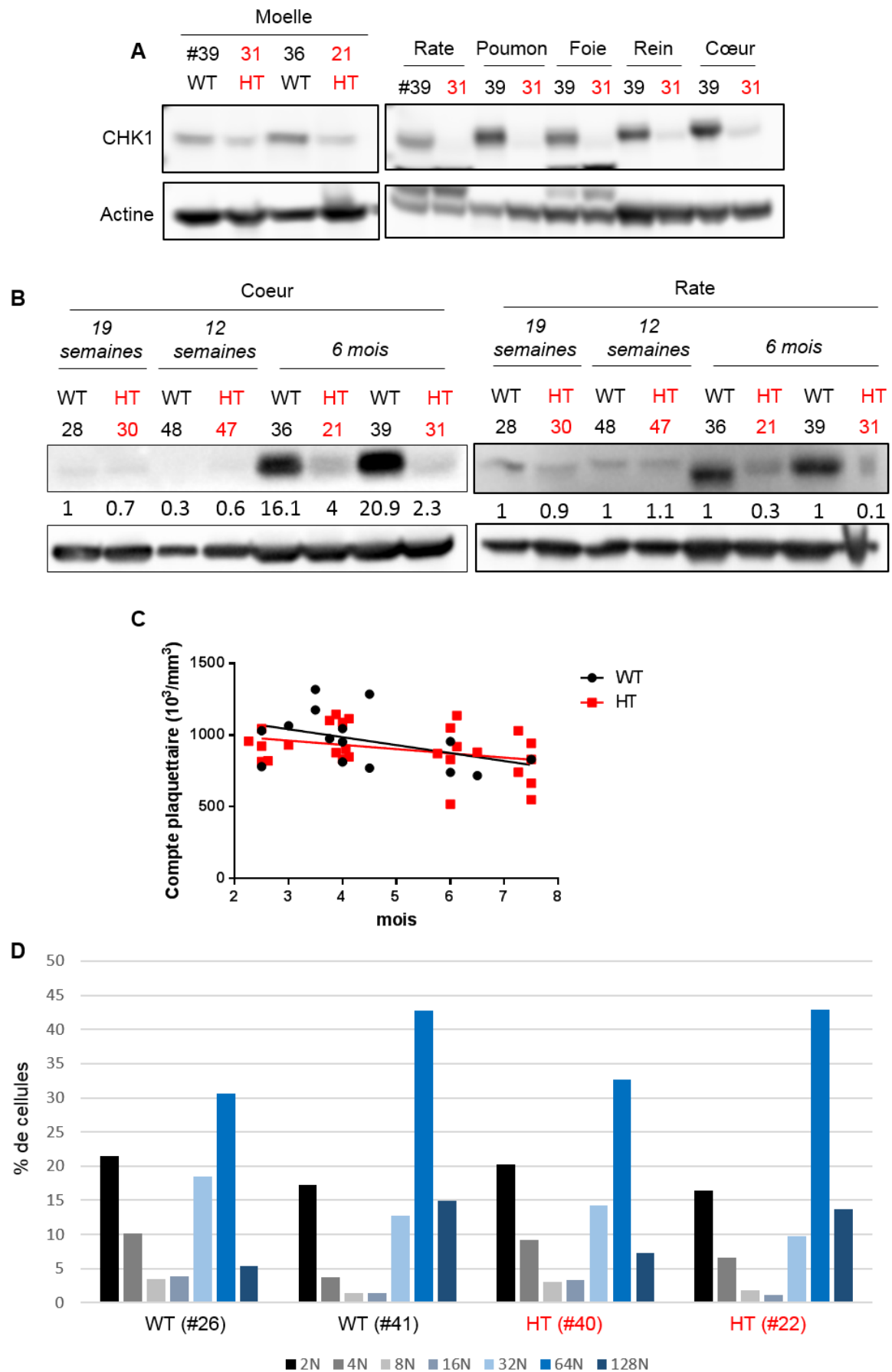
Pour tenter de comprendre la différence du niveau protéique de CHK1 entre les souris âgées de 12 ou 19 semaines (Figure 62D et E), et celles âgées de 24 semaines (Figure 63A), nous avons étudié le niveau protéique de CHK1 de ces souris lors d'une même analyse par western blot (Figure 63B). Grâce à cette étude, nous pouvons voir très nettement que le niveau protéique de CHK1 dans les souris HT ne varie pas en fonction de l'âge des souris, mais que chez les souris WT, une très forte augmentation du niveau

protéique de CHK1 est observée chez les souris âgées de 24 semaines. Ainsi, il semblerait que CHK1 soit fortement augmentée au cours du vieillissement.

Au vu de cette importante régulation de CHK1 au cours du temps, nous avons donc émis l'hypothèse que la différence de résultats obtenus par Boles et par nous-même sur la diminution du nombre de plaquette, était dépendant de l'âge des souris, puisque chez les souris jeunes utilisées lors de nos premières études (Figure 62B) aucune différence du niveau protéique de CHK1 n'est visible entre les souris WT et HT. Nous avons donc entrepris d'étudier le compte plaquettaire des souris WT ou HT pour CHK1 au cours de leur vieillissement, afin de déterminer l'âge à partir duquel une différence physiologique est visible. Pour l'heure, le nombre de plaquettes a pu être étudié sur des souris âgées de 8 à 30 semaines (7 mois), mais aucune différence sur le comptage plaquettaire n'est visible (Figure 63C). De plus, des progéniteurs mégacaryocytaires de souris WT et HT pour CHK1 âgées de 7 mois ont été purifiés à partir des os longs des pattes des souris, et ces cellules ont été traitées pendant 3 jours à la Thrombopoïétine (TPO), permettant l'induction de la différenciation mégacaryocytaire. L'analyse de la polyploïdisation de ces cellules murines WT ou HT, après induction de la différenciation, ne révèle aucune modification dans leur capacité à effectuer leur maturation nucléaire par polyploïdisation *in vitro* (Figure 63D).

Il semble donc que, malgré une différence drastique du niveau protéique des CHK1 entre les souris WT et HT pour CHK1 âgées de 7 mois, aucune différence physiologique sur la capacité de polyploïdisation des mégacaryocytes ou sur le nombre de plaquettes circulantes n'est visible. Il est donc nécessaire d'attendre encore que les souris vieillissent pour voir si, sur des souris âgées de 52 semaines, le résultat publié par Boles est retrouvé, et déterminer ainsi le moment où une différence physiologique est visible chez ces souris.

Figure 63 : Etude de l'impact de l'haplo-insuffisance de CHK1 chez des souris âgées. **A** : Evaluation par western blot du niveau protéique de CHK1 dans des échantillons primaires de souris sauvages (WT) ou hétérozygotes (HT) pour CHK1, âgées de 6 mois dans la moelle et d'autres organes. **B** : Evaluation par western blot du niveau protéique de CHK1 dans des échantillons primaires de souris sauvages (WT) ou hétérozygotes (HT) pour CHK1, en fonction de l'âge des souris, dans le cœur et la rate. **C** : Comptage plaquettaire des souris sauvages (WT) ou hétérozygotes (HT) âgées de 2 à 7,5 mois, femelles et mâles confondus. **D** : Représentation de l'analyse de la polyploïdisation par un marquage à l'iodure de propidium dans les progéniteurs murins traités à la TPO (50ng/mL) pendant 3 jours, obtenus de souris sauvages (WT) ou hétérozygotes (HT) pour CHK1, âgées de 7 mois.

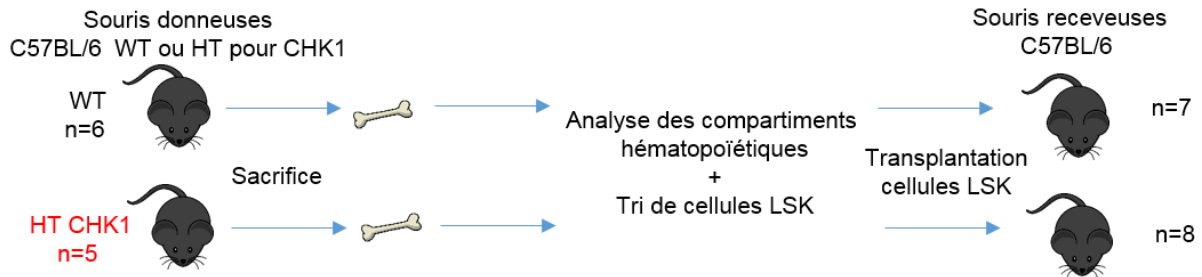


En parallèle, et dans l'attente que les souris vieillissent et atteignent 52 semaines pour poursuivre ces premières études, nous avons envisagé des manipulations avec les cellules souches WT ou HT pour CHK1, afin de tester le potentiel des cellules Lin⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺ (LSK) à reformer l'ensemble des compartiments hématopoïétiques et donc déterminer l'impact de l'haplo-insuffisance pour CHK1 dans ce contexte. Ainsi, en collaboration avec Bastien Gerby et Vincent Fregona au CRCT, nous avons effectué une transplantation de cellules souches LSK des souris WT ou HT pour CHK1, dans des souris C57Bl/6 receveuses. Le plan expérimental est présenté Figure 64A, mais brièvement, les souris donneuses WT et HT (CD45.1) âgées de 16 semaines ont été sacrifiées afin de récupérer les cellules de la moelle des os longs des pattes. Après tri cellulaire, 6500 cellules LSK, contenant les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs multipotents capables après transplantation de reconstituer l'ensemble de l'hématopoïèse, ont été triées puis injectées en rétro-orbital chez les souris receveuses. Les souris receveuses (CD45.2) ont été prétraitées 24 h avant la transplantation avec une dose sub-létale de busulfan (30 mg/kg), afin d'éliminer les cellules de la moelle de la souris, et permettre aux cellules donneuses d'envahir la moelle et récapituler l'hématopoïèse. Le but de cette expérience était de stimuler les cellules souches donneuses WT ou HT pour CHK1 pour tenter d'exacerber les effets de la perte d'un allèle de CHK1 lors de la reconstitution de l'hématopoïèse. Au moment du sacrifice des souris donneuses, une étude de la répartition des cellules dans les compartiments hématopoïétiques a été effectuée par cytométrie de flux en récupérant les cellules de la moelle osseuse des os longs, pour comparer les souris WT et HT pour CHK1 avant transplantation (Figure 64B). Aucune différence sur le nombre de progéniteurs d'intérêt pour notre étude, c'est-à-dire les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et mégacaryocyte-érythrocytes (MEP), n'est visible. De plus, l'étude des progéniteurs murins mégacaryocytaires avant la transplantation, ne révèle aucune variation de la proportion des cellules exprimant le marqueur CD41a et CD42b, entre les souris WT et HT pour CHK1 (Figure 64C). Il est tout de même intéressant de noter que l'étude globale révèle une diminution significative du nombre de cellules souches LSK et de cellules du lignage B chez les souris HT pour CHK1. Ceci est en accord avec des données de la littérature, puisque deux études publiées par Schuler et ses collaborateurs révèlent un rôle essentiel de CHK1 dans la survie des cellules B (Schuler et al., 2017) et des cellules souches hématopoïétiques (Schuler et al., 2019).

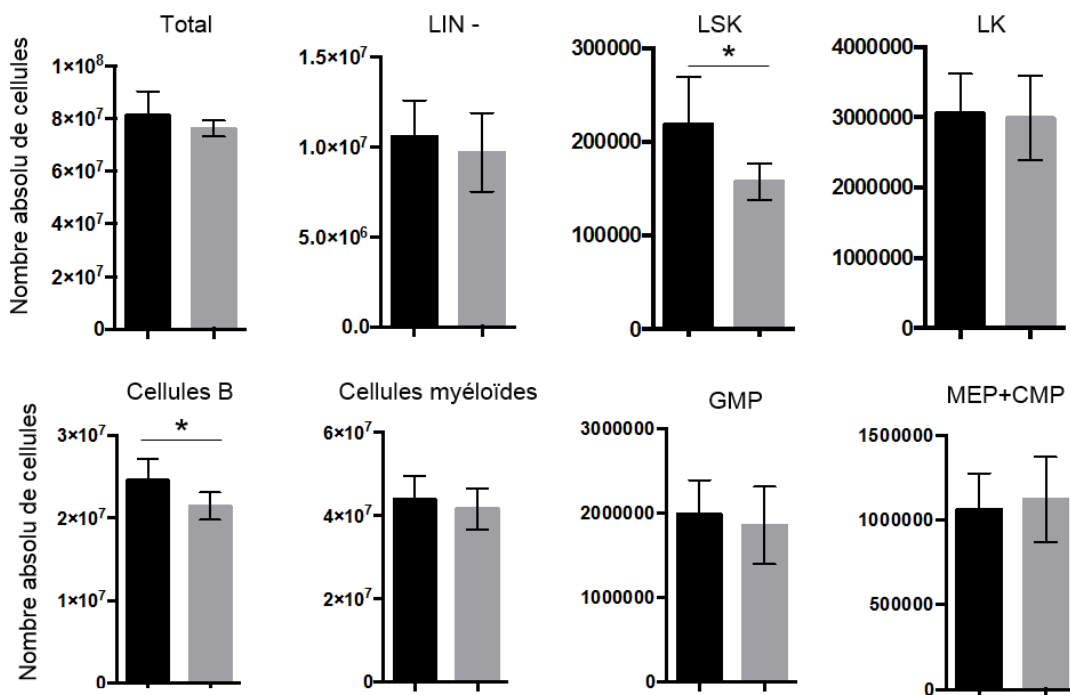
Figure 64 : Analyse des compartiments hématopoïétiques des souris donneuses avant transplantation. A : Plan expérimental pour la transplantation des souris. Des souris C57BL/6 sauvages ou hétérozygotes pour CHK1 donneuses CD45.1 ont été sacrifiées afin de récupérer les cellules souches immatures LSK de la moelle osseuse. Après tri, 6500 cellules ont été injectées dans chaque souris receveuse CD45.2, préalablement préparée avant la transplantation par une injection sub-létale de busulfan (30 mg/kg). **B :** Analyse des différents compartiments hématopoïétiques des souris sauvages (WT n=6) ou hétérozygotes (HT n=5) pour CHK1 par cytométrie de flux, avec le nombre total de cellule de la moelle (Total), le nombre de cellules souche immatures Lin⁻ (LIN⁻), les cellules Lin⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺ (LSK), les cellules Lin⁻ Sca1⁻ c-Kit⁺ (LK), ainsi que les cellules du compartiment lymphoïde (Cellules B), myéloïde, granulocyte-macrophage (GMP) et les progéniteurs myéloïdes communs et mégacaryocyte-érythrocytes (MEP + CMP). L'analyse statistique a été effectuée grâce à un t-test non apparié avec correction de Welch. * $P \leq 0.05$ **C :** Analyse du marqueur de surface CD41a et CD42b dans les progéniteurs

mégacaryocytaires murins des souris donneuse sauvages (WT) ou hétérozygotes (HT) pour CHK1. D : Schéma de l'hématopoïèse d'après Shao et al., 2013.

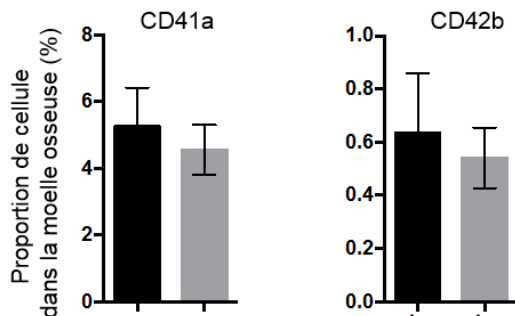
A Transplantation



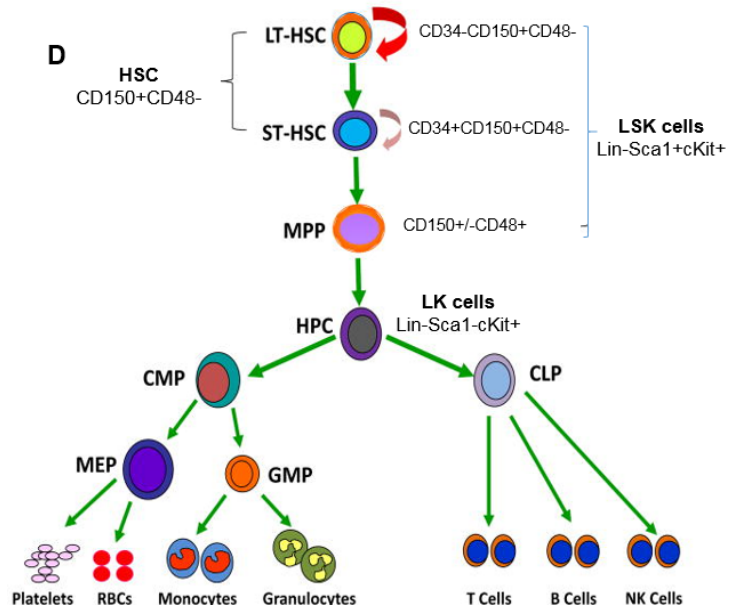
B Analyse des compartiments hématopoïétiques souris donneuses



C Analyse marqueurs mégacaryocytaires



D

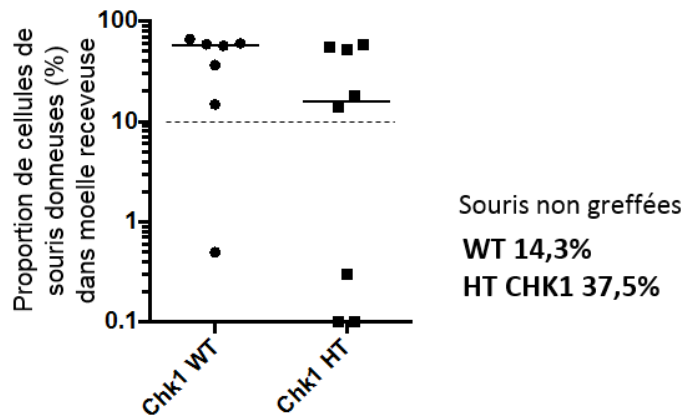


Après cette étude des compartiments hématopoïétiques et un tri, 6500 cellules Lin- Sca1+ c-Kit+ ont été injectées en rétro-orbital chez chaque souris receveuse. Deux mois après la transplantation, l'efficacité de prise de greffe ainsi que l'analyse des différents compartiments hématopoïétiques a été effectuée. Grâce à un prélèvement de moelle dans le fémur des souris, effectué sans sacrifier les souris, nous avons pu évaluer le pourcentage de cellules de la souris donneuse CD45.1 dans la moelle de la souris receveuse CD45.2. La greffe est établie lorsque plus de 10% de la moelle est envahie par les cellules de la souris donneuse. De manière inattendue, bien que le même nombre de cellules LSK ait été injecté dans les souris receveuses, la prise de greffe des cellules donneuses HT pour CHK1 se révèle moins efficace (3 souris sur 8 non prises en greffe avec les cellules issues de souris HT pour CHK1, contre 1 souris sur 7 avec les cellules issues de souris WT) (Figure 65A). L'analyse des compartiments hématopoïétiques 2 mois après transplantation ne révèle aucune différence sur le nombre de progéniteurs d'intérêt pour notre étude, c'est-à-dire les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et mégacaryocytes-érythrocytes (MEP) (Figure 65B), ni sur les marqueurs de la voie mégacaryocytaire dans ces cellules murines après la transplantation, entre les souris WT et HT pour CHK1 (Figure 65C). De manière intéressante, en comparaison à l'étude effectuée avant la transplantation, aucune différence significative n'est visible sur la proportion de cellules LSK entre les souris WT et HT pour CHK1, mais une diminution du nombre de LK (progéniteurs engagés) est visible (Figure 65B).

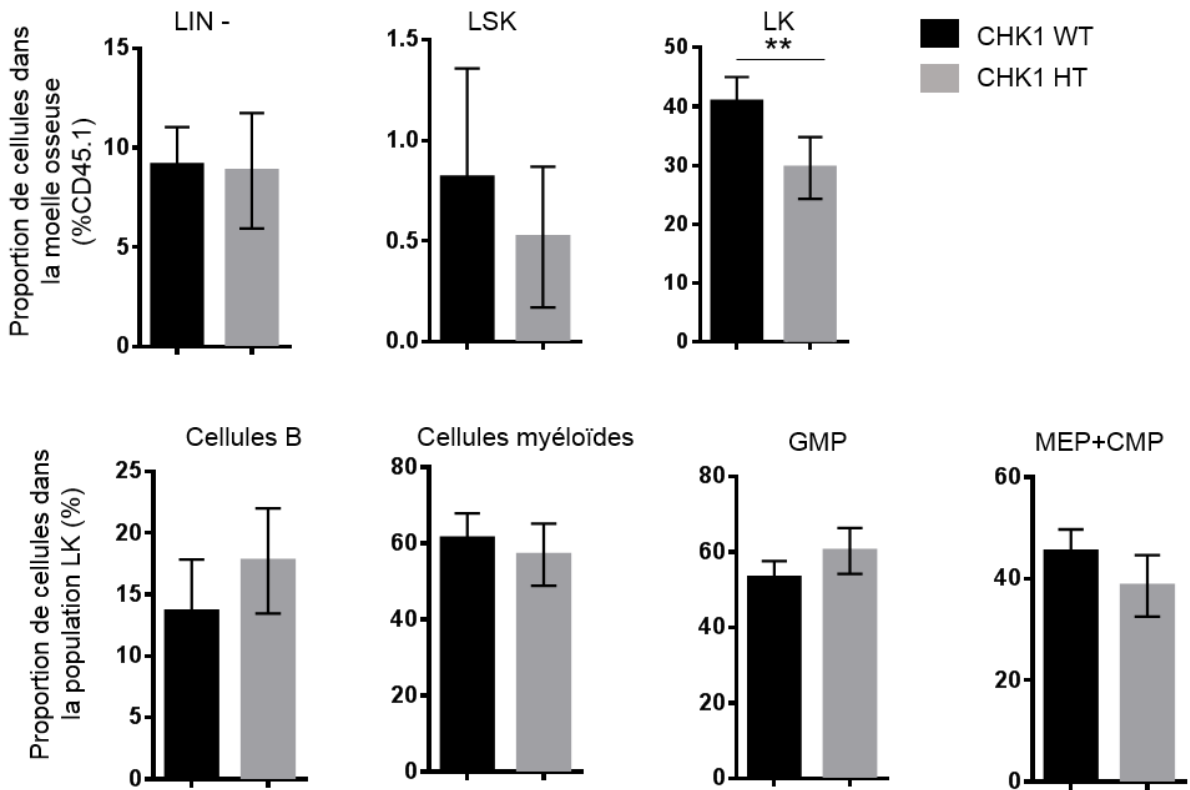
La transplantation ne permet donc pas de voir de modifications sur le nombre de progéniteurs mégacaryocytes-érythrocytes comme espéré, et il est donc nécessaire d'attendre que nos souris WT ou HT pour CHK1 vieillissent, afin de définir le moment où l'impact physiologique sur les mégacaryocytes et les plaquettes pourra être visible.

Figure 65 : Analyse des compartiments hématopoïétiques des souris receveuses (CD45.2) 2 mois après transplantation. A : Analyse du niveau de prise de greffe des souris receveuses avec les souris donneuses. La greffe est établie quand plus de 10% de la moelle est envahie par les cellules des souris donneuses. **B :** Analyse des différents compartiments hématopoïétiques des souris receveuses prises en greffe sauvages (WT n=6) ou hétérozygotes (HT n=5) pour CHK1 par cytométrie de flux, avec le nombre de cellules Lin- Sca1+ c-Kit+ capable de se différencier (LSK), les cellules Lin- Sca1- c-Kit+ (LK), ainsi que les cellules du compartiment lymphoïde (Cellules B), myéloïde, granulocyte-macrophage (GMP) et les progéniteurs myéloïdes communs et mégacaryocyte-érythrocytes (MEP + CMP). L'analyse statistique a été effectuée grâce à un t-test non apparié avec correction de Welch. ** $P \leq 0.01$ **C :** Analyse du marqueur de surface CD41a et CD42b dans les progéniteurs mégacaryocytaires murins des souris receveuses prises en greffe sauvages (WT) ou hétérozygotes (HT) pour CHK1, deux mois après la transplantation.

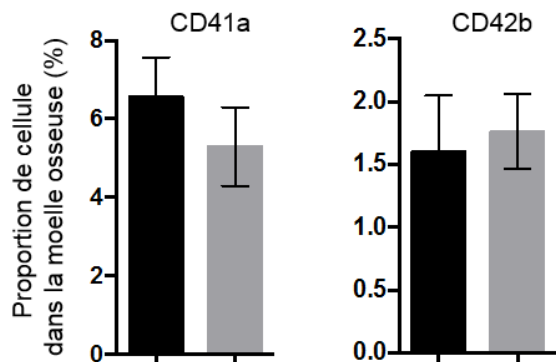
A Analyse de la prise de greffe



B Analyse des compartiments hématopoïétiques souris receveuses 2 mois après transplantation



C Analyse marqueurs mégacaryocytaires



En parallèle de ce travail *in vivo*, des expériences *in vitro* ont été menées afin de déterminer comment CHK1 peut réguler la différenciation mégacaryocytaire suite aux résultats obtenus par Laure David. Grâce à l'étude protéomique effectuée avant mon arrivée dans la lignée HEL traitée au PMA, de nombreux partenaires de CHK1 nous ont semblé intéressants à étudier, car préalablement décrits comme impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire. L'intérêt de l'équipe s'est porté sur le facteur de transcription NF-E2, dont l'expression est cruciale pour la maturation des mégacaryocytes ainsi que pour la production des pro-plaquettes.

Dans un premier temps, il était nécessaire de valider l'interaction trouvée par l'étude protéomique des partenaires de CHK1. Pour étudier l'interaction entre ces deux protéines, des co-immunoprécipitations de NF-E2 ont été réalisées dans les cellules HEL, permettant de confirmer que CHK1 et NF-E2 sont présentes dans un même complexe de manière spécifique (Figure 66A et B).

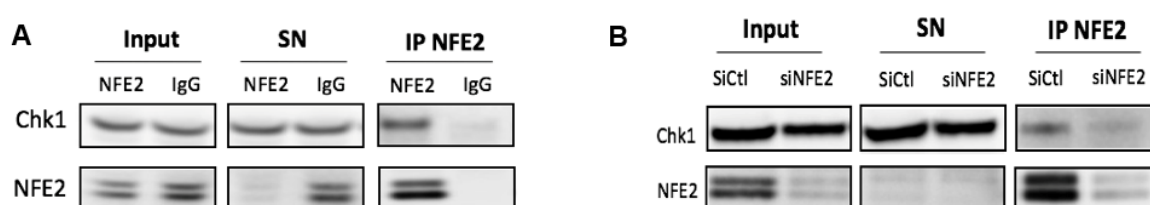


Figure 66 : Étude de l'interaction entre la protéine CHK1 et le facteur de transcription NF-E2. A:

Western blot obtenu après immunoprécipitation de NF-E2 (ou l'IgG correspondant à l'anticorps pour contrôle) dans les cellules HEL. La fraction surnageant est indiquée par SN. **B** : Western blot obtenu après immunoprécipitation de NF-E2 dans les cellules HEL. 48 h avant l'immunoprécipitation, les cellules ont été transfectées par 300 nM de siARN dirigé contre NF-E2 ou un siARN contrôle (CTL).

L'hypothèse émise est que CHK1, *via* son activité kinase, peut réguler la phosphorylation de NF-E2, pouvant ainsi entraîner une modification de sa stabilité, de sa localisation et/ou de son activité. Afin de déterminer si CHK1 peut réguler NF-E2 *via* une ou plusieurs phosphorylations, une étude *in silico* a tout d'abord été effectuée afin de rechercher les sites consensus de phosphorylation de la kinase CHK1 (M/I/L/V-X-R/K-XX-S/T) (Hutchins et al., 2000) sur la séquence protéique de NF-E2. Plusieurs sites potentiels de phosphorylation par la kinase CHK1 sur la séquence NF-E2 ont été trouvés, en particulier le résidu serine 111 qui respecte parfaitement la séquence consensus de phosphorylation par CHK1. Afin de déterminer si ce site de NF-E2, ou d'autres, pouvaient être phosphorylés par CHK1, des tests kinases ont été effectués et une analyse phospho-protéomique a été réalisée en collaboration avec la plateforme de protéomique 3p5 de l'institut Cochin à Paris. Brièvement, la protéine recombinante NF-E2 en présence et en absence de la kinase CHK1 et d'ATP, a été digérée d'une part avec de la trypsine/chymotrypsine et d'autre part avec de la chymotrypsine. Grâce à l'analyse par spectrométrie de masse, plusieurs sites de NF-E2 phosphorylés par CHK1 ont pu être découverts (Figure 67) : la sérine 153 (retrouvée le plus fortement phosphorylée) et les thréonines 205, 239 et 290. Il est intéressant de

noter que ces sites retrouvés phosphorylés ne correspondent pas strictement à la séquence consensus décrite pour CHK1, et que le site serine 111 qui respecte parfaitement la séquence consensus de phosphorylation par CHK1 n'est pas retrouvé phosphorylé ici. De plus, aucune étude préalable ne rapporte ces sites de NF-E2 phosphorylés (données disponibles en ligne sur Phospho Site Plus <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=3769&showAllSites=true>) (Figure 68).

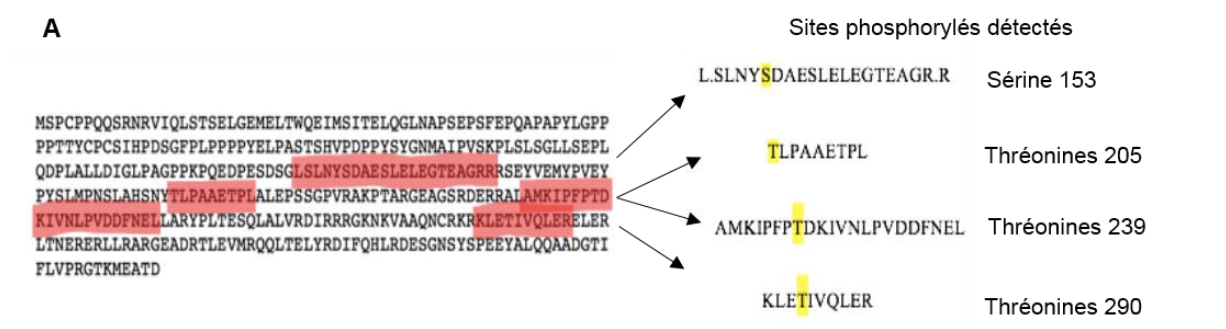


Figure 67 : Etude par phospho-protéomique des sites de phosphorylations par CHK1 sur la séquence NF-E2. A : Séquence protéique de NF-E2. Les peptides détectés après digestion sont indiqués en rouge. Les acides aminés détectés comme phosphorylés par CHK1 sont indiqués en jaune.

NF-E2 (human)	
Y194-p	NSLAHSN _Y TLPAET ▼
K215-ub	SSGPFVRAKPTARGEA ▼
K234-ub	ERRALAMKIPFPTDK ▼
K241-ub	KIPFPTDKIVNLPVD ▼
S346-p	DESGNSYsPEEYALQ ▼
K368-ub	FLVPRGTkMEATD__ ▼
K368-sm	FLVPRGTkMEATD__ ▼

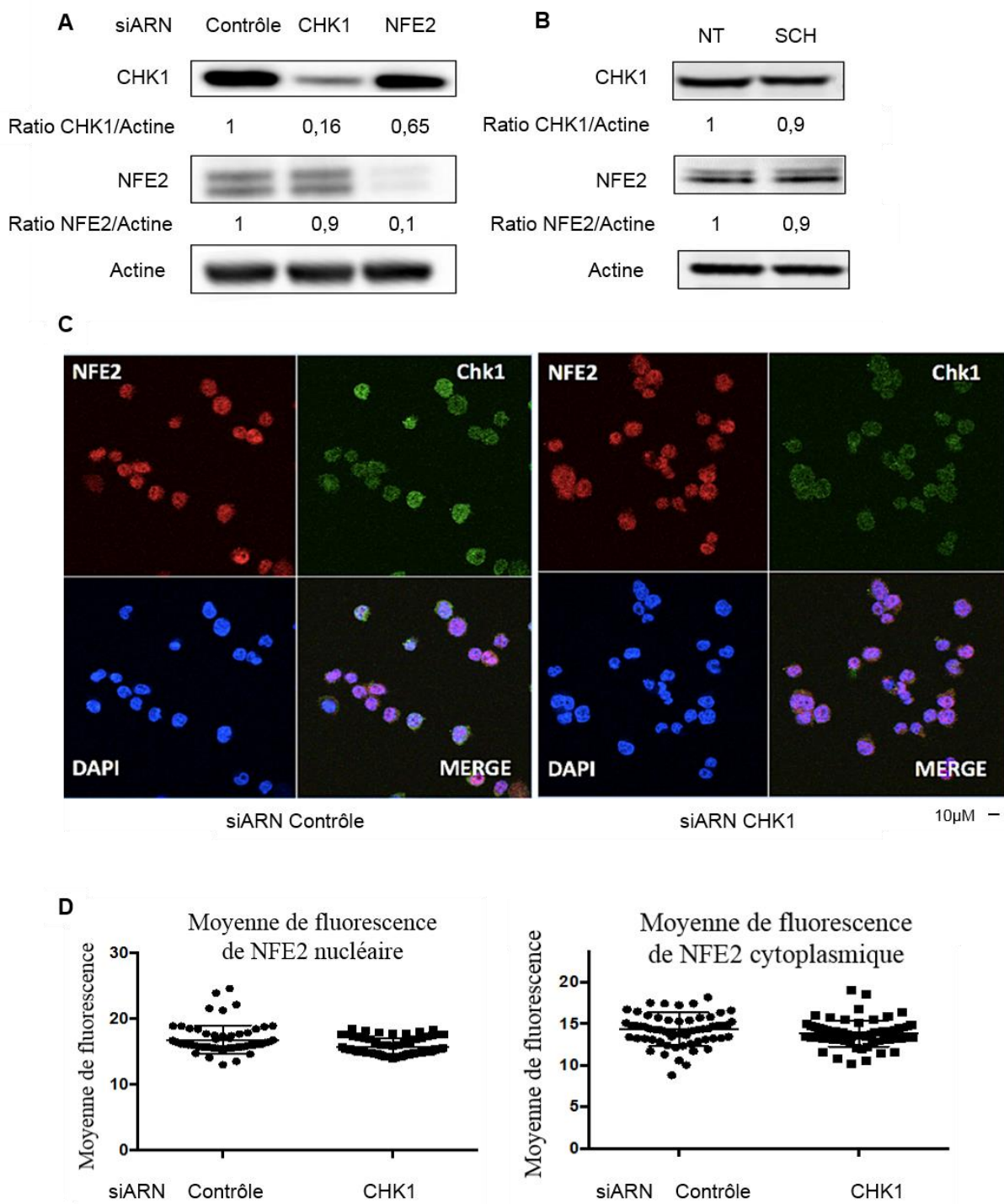
Figure 68 : Liste des sites de NF-E2 identifiés actuellement pour présenter des modifications post-traductionnelles. Données obtenues sur le site Phospho Site Plus (<https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=3769&showAllSites=true> – en ligne, consulté en juillet 2019)

Ces résultats indiquent que CHK1 pourrait potentiellement phosphoryler NF-E2 sur des sites nouvellement identifiés, et nous permet d'émettre l'hypothèse que cette phosphorylation pourrait avoir lieu dans le contexte de différenciation mégacaryocytaire.

Suite à ces résultats, la phosphorylation potentielle sur le résidu sérine 153 a particulièrement attiré notre attention, car il s'agit du site retrouvé le plus fortement phosphorylé par l'étude phosphoprotéomique, et de par son emplacement dans le domaine trans-activateur de NF-E2. Afin de poursuivre l'étude de ce site de phosphorylation par CHK1, nous allons générer des mutants phosphomimétique ou non phosphorylable de ce site et nous allons lancer, avec la société Eurogentec, la production d'un anticorps phospho-spécifique dirigé contre le site phosphorylé sérine 153 du facteur de transcription NF-E2.

En parallèle de cette étude phospho-protéomique, et dans le but d'étudier le lien fonctionnel entre ces deux protéines, plusieurs expériences ont été effectuées afin de déterminer si CHK1 peut réguler la stabilité, la localisation et/ou l'activité de NF-E2. Dans un premier temps, des expériences d'inactivation par siARN (Figure 69A) ou d'inhibition pharmacologique (SCH900776) de CHK1 (Figure 69B) ont été effectuées dans les cellules HEL, mais aucun impact sur le niveau protéique de NF-E2 n'a été observé. Afin de déterminer si CHK1 peut impacter la localisation subcellulaire de NF-E2, une immunofluorescence a été effectuée sur des cellules HEL transfectées avec un siARN dirigé contre CHK1 (Figure 69C). Là encore, CHK1 ne semble pas moduler la localisation sub-cellulaire de NF-E2 (Figure 69D).

Figure 69 : Etude de l'impact de l'inactivation de CHK1 sur NF-E2. **A :** Les cellules HEL ont été transfectées par des siARN contrôle ou dirigés contre NF-E2 et CHK1, et le niveau protéique a été analysé par western blot 48 h après la transfection. **B :** Les cellules HEL ont été traitées avec l'inhibiteur pharmacologique de CHK1 (SCH-900776 à 500 nM) pendant 24 h, puis le niveau protéique a été analysé par western blot. **C :** Images obtenues au microscope confocal après avoir effectué une immunofluorescence dirigée contre CHK1 et NF-E2 dans les cellules HEL transfectées par des siARN contrôle ou dirigés contre CHK1 ou NF-E2 pendant 48 h. L'ADN des cellules a été marqué au DAPI. **D :** La quantification des images d'immunofluorescence a été effectuée grâce aux logiciels Zen et ImageJ pour déterminer l'intensité moyenne de fluorescence de NF-E2 cytoplasmique et nucléaire. Pour la moyenne de fluorescence de NF-E2 nucléaire siARN CTL=16,79±0,27 (n=63 noyaux) / siARN CHK1=15,76±0,16 (n=64 noyaux). Pour la moyenne de fluorescence de NF-E2 cytoplasmique : siARN CTL=14,28±0,26 (n=63 noyaux) / siARN CHK1=13,82±0,19 (n=65 noyaux)



Au vu de l'absence d'impact de l'invalidation de CHK1 sur le niveau protéique ou la localisation sub-cellulaire de NF-E2, nous nous sommes demandés si CHK1 pouvait impacter son activité transcriptionnelle. Pour répondre à cette question, les cellules HEL ont été traitées pendant 72 h avec du PMA (3 nM) pour induire la différenciation, et un traitement à l'inhibiteur de CHK1 (SCH900776 500 nM) a été ajouté pendant les 24 dernières heures. Plusieurs RT-qPCR ont ensuite été effectuées afin d'étudier le niveau d'ARNm des cibles transcriptionnelles de NF-E2 que sont la thromboxane A synthase 1 (TBX) (Deveaux et al., 1997) et la P-selectine (SELP) (Fujita et al., 2013). Après 72 h de traitement au PMA, la différenciation mégacaryocytaire a bien été induite, comme en témoigne l'augmentation significative du niveau d'ARNm des cibles transcriptionnelles de NF-E2, TXS et Selp (Figure 70A). Pourtant, l'inhibition de CHK1 n'induit aucune modification significative sur le niveau d'ARNm de ces cibles. En utilisant ensuite les cellules HEL inductibles pour un shARN dirigé contre CHK1, nous avons reproduit l'expérience précédente, mais en traitant les cellules au PMA et en induisant le shARN de CHK1 pendant 24 h (Figure 70B). L'induction du shARN dirigé contre CHK1 est bien efficace comme montré par western blot et par quantification du niveau de l'ARNm de CHEK1. Le traitement au PMA pendant 24 h induit une augmentation du niveau des cibles transcriptionnelles de NF-E2, TBXAS1 et Selp1, montrant là encore que la différenciation mégacaryocytaire est bien stimulée. De manière très intéressante, nous pouvons voir que l'induction du shARN dirigé contre CHK1 induit une diminution significative du niveau des cibles transcriptionnelles de NF-E2 en comparaison à la condition PMA seule (Figure 70B), sans aucune modification du niveau de l'ARNm de NF-E2. Ainsi, l'invalidation de CHK1 par shARN modifie le niveau d'ARNm des cibles transcriptionnelles de NF-E2.

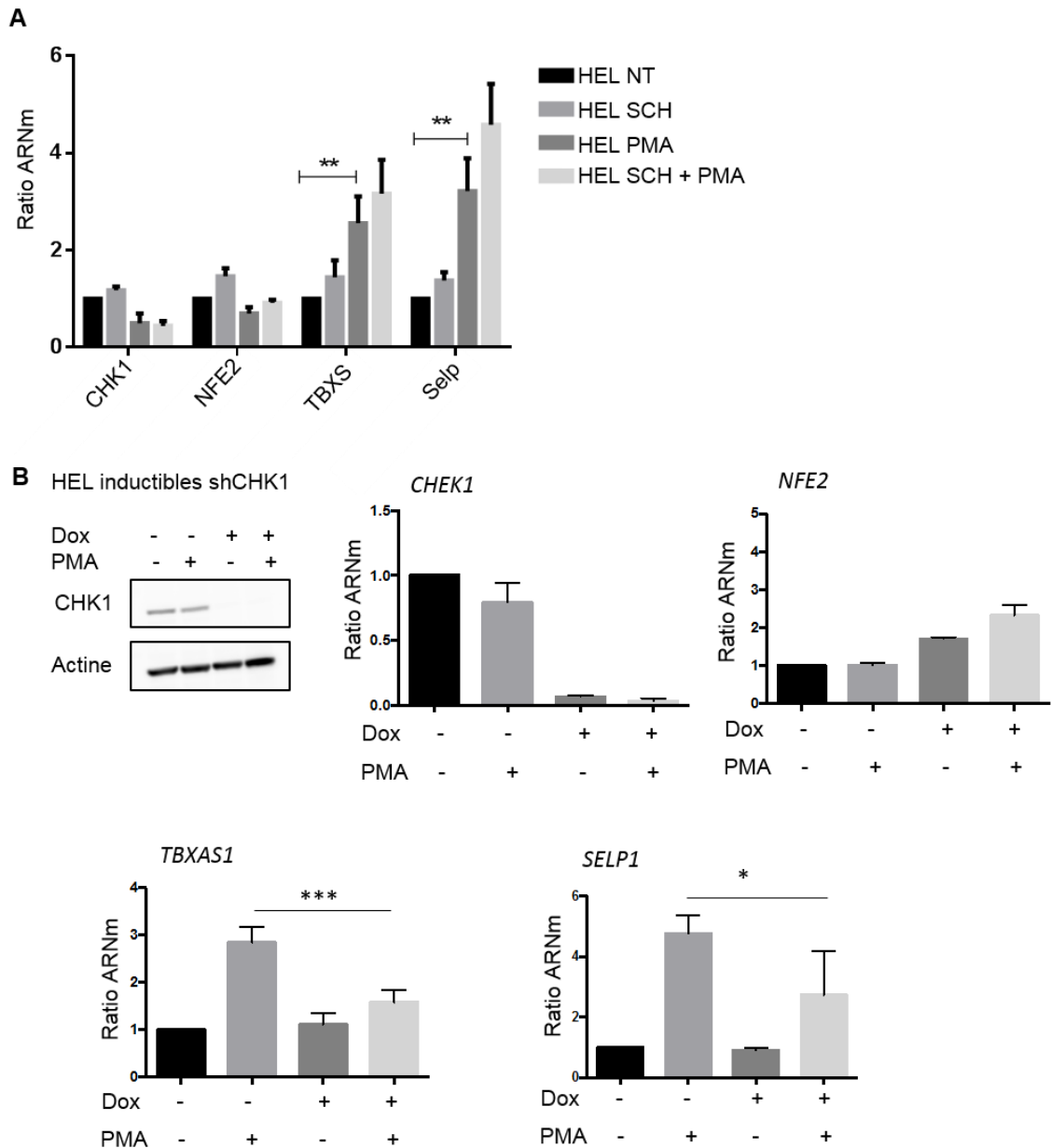


Figure 70 : Étude de l'activité transcriptionnelle de NF-E2 lors de l'inactivation pharmacologique ou par shARN de CHK1 dans les cellules HEL. **A** : Quantification par RT-qPCR de l'expression de l'ARNm de CHK1, NFE2, TXS et Selp 24 h après traitement des cellules HEL par l'inhibiteur pharmacologique SCH900776, avec traitement ou non au PMA pendant 72 h (n=5). Test statistique de Mann-Whitney a été effectué. Seule la significativité est indiquée ici par ** $P \leq 0.01$. **B** : La lignée cellulaire HEL stable inductible pour un shARN dirigé contre CHK1 a été utilisée. Un western blot de l'inactivation de CHK1 après traitement à la doxycycline est présenté. Les graphiques représentent la quantification par RT-qPCR de l'expression des ARNm de CHEK1, NFE2, TBXS et Selp 24 h après traitement des cellules HEL au PMA (3 nM) et l'induction du shARN dirigé contre CHK1 par doxycycline (n=4). L'analyse statistique a été effectuée par un test de student.

Afin de poursuivre cette étude dans un modèle plus physiologique, nous avons effectué une analyse par RT-qPCR des cibles transcriptionnelles de NF-E2 dans les progéniteurs mégacaryocytaires purifiés des souris WT ou HT pour CHK1 âgées de 24 semaines (6 mois) (Figure 71A). De manière très intéressante, une diminution significative des niveaux des ARNm des trois cibles transcriptionnelles de NF-E2 étudiées est retrouvée chez les souris HT pour CHK1 en comparaison aux souris WT (Figure 71B). Ces variations du niveau d'ARNm de Selp, MYL9 et TBXAS1 sont visibles alors qu'aucune modification du niveau de l'ARNm ou de la protéine NF-E2 (Figure 71C et D), mais qu'une diminution du niveau protéique de CHK1 est visible. Bien que le lien reste à être clairement établi, ces résultats sont en accord avec nos résultats obtenus sur la lignée HEL, et avec notre hypothèse selon laquelle CHK1 pourrait phosphoryler NF-E2 sur la sérine 153, présente dans son domaine trans-activateur, pouvant permettre l'activation transcriptionnelle de NF-E2. Ainsi, en cas de perte de CHK1, comme dans les souris HT, l'activité transcriptionnelle de NF-E2 serait réduite, induisant une diminution du niveau d'ARNm de ses cibles et perturbant ainsi la différenciation mégacaryocytaire.

Pourtant, malgré cette forte diminution du niveau des ARNm des cibles transcriptionnelles de NF-E2, aucun phénotype n'est visible chez les souris à cet âge, au niveau du nombre de plaquette ou de la capacité de polyploïdisation des progéniteurs mégacaryocytaires (Figure 63C et D). Pour tenter de comprendre ceci, nous avons étudié le niveau protéique d'une des cibles transcriptionnelle de NF-E2 dans ces souris, la myosine 9, et nous pouvons voir qu'aucune modification du niveau protéique de la chaîne légère de la myosine MLC n'est visible entre les souris WT et HT pour CHK1 (Figure 71D). Comme décrit pour CHK1 précédemment, là encore le niveau de l'ARNm et de la protéine ne sont pas corrélés dans ces souris, pouvant expliquer que, bien que le niveau d'ARNm des cibles transcriptionnelles de NF-E2 soit diminué, le niveau protéique de ces cibles est encore identique entre les souris, les protégeant d'un défaut de différenciation mégacaryocytaire. Ainsi, le vieillissement pourrait là encore jouer un rôle.

Bien que cette étude pose encore de nombreuses questions à approfondir, l'ensemble de ces premières expériences *in vitro* et *in vivo* apportent des résultats totalement novateurs en montrant que la kinase CHK1 serait capable de phosphoryler un facteur de transcription, régulant potentiellement son activité transcriptionnelle, et que la régulation de CHK1 et son rôle dans la différenciation mégacaryocytaire seraient dépendants du vieillissement chez la souris.

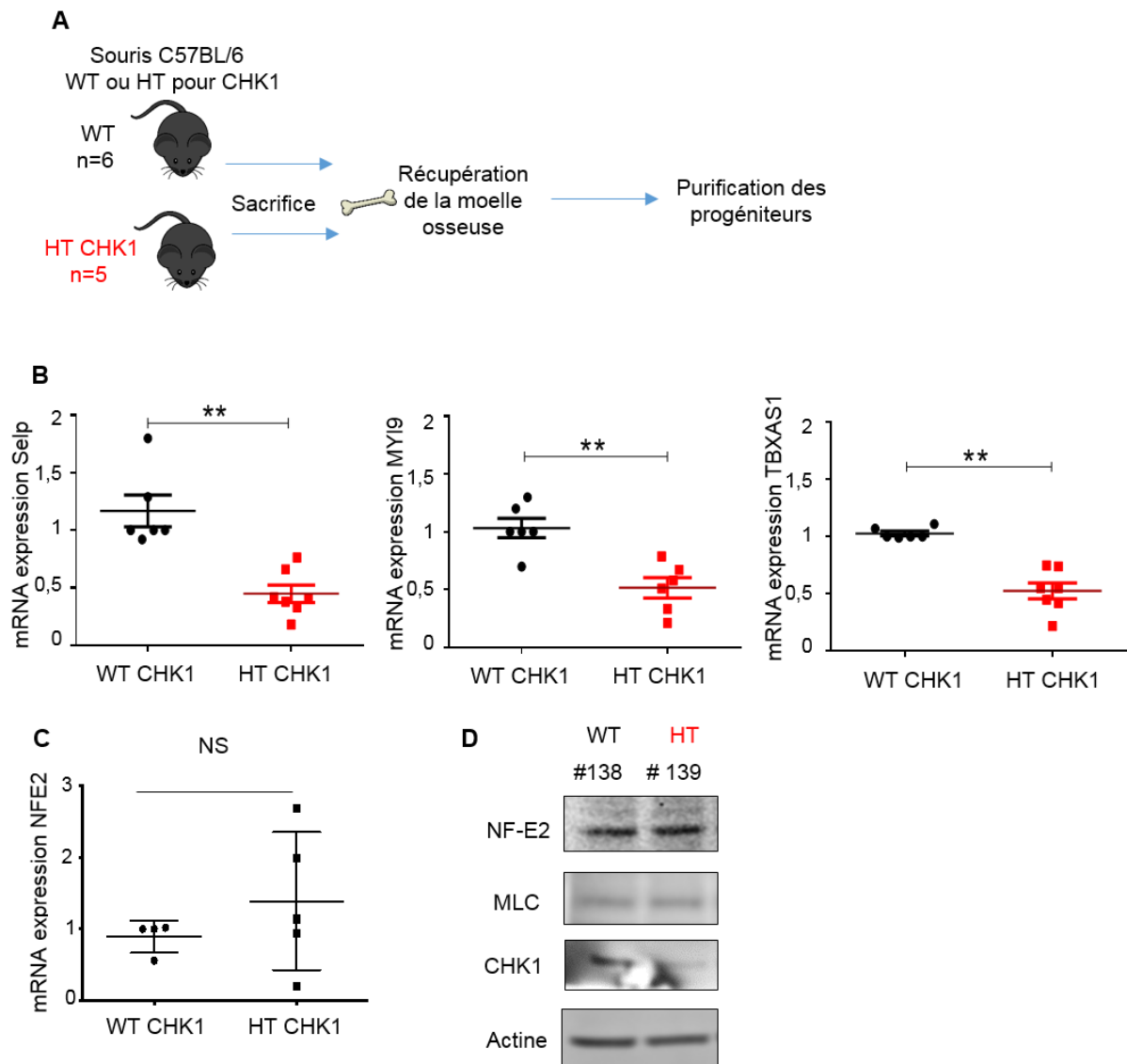


Figure 71 : Étude de l'expression des cibles transcriptionnelles de NF-E2 dans les progéniteurs murins purifiés à partir de souris sauvages ou hétérozygotes pour CHK1. **A** : Plan expérimental pour la purification des progéniteurs murins. Des souris C57BL/6 sauvages ou hétérozygotes pour CHK1 ont été sacrifiées afin de récupérer les progéniteurs mégacaryocytaires de la moelle osseuse. **B** : Analyse par RT-qPCR de l'expression de l'ARNm des cibles transcriptionnelles de NFE2 : TBX1, My19 et Selp (n=6 pour WT et n=7 pour HT âgées de 16 à 24 semaines). Test statistique de Mann-Whitney ** $P \leq 0.01$. **C** : Analyse par RT-qPCR de l'expression de l'ARNm de NFE2 (n=4 pour WT et n=5 pour HT). Test statistique de Mann-Whitney, ns = non significatif. **D** : Analyse par Western Blot du niveau protéique de NFE2, MCL et CHK1 dans une souris WT et HT pour CHK1 âgées de 24 semaines

IV. Discussion et perspective

Des travaux effectués précédemment dans l'équipe par Laure David ont montré l'importance de CHK1 pour le bon déroulement du processus de différenciation mégacaryocytaire, à la fois dans des lignées cellulaires et dans un modèle de cellules primaires murines. Lors de ce travail, des partenaires de CHK1 potentiellement impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire avaient été identifiés, mais sans qu'un lien entre ces protéines et CHK1 ne soit défini. Aujourd'hui, à travers les travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* au cours de ma thèse, nous pouvons avancer l'hypothèse que CHK1 semble capable de phosphoryler et de réguler l'activité transcriptionnelle de NF-E2, permettant d'expliquer son rôle observé dans la différenciation mégacaryocytaire.

Bien que ces travaux nécessitent d'être encore étudiés et approfondis, cette étude apporte de nombreux résultats très intéressants et révèle une possible nouvelle fonction de CHK1, ouvrant des pistes quant au rôle de cette kinase dans le processus de différenciation mégacaryocytaire et dans la régulation du facteur de transcription NF-E2.

Un des objectifs de ce travail était donc de déterminer si CHK1 agit au cours de la différenciation mégacaryocytaire *via* un des partenaires identifiés dans l'analyse par spectrométrie de masse effectuée en collaboration avec la plateforme de protéomique de l'institut Cochin. Grâce aux expériences réalisées *in vitro*, nous montrons qu'un lien semble exister entre CHK1 et NF-E2. Mais ce lien, ainsi que son impact sur les cibles transcriptionnelles de NF-E2 et sur la différenciation mégacaryocytaire reste à établir de manière plus forte. Pour ce faire, nous sommes actuellement en train de mettre en place au sein de l'équipe la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), afin de déterminer si l'inactivation de CHK1 perturbe le recrutement de NF-E2 à la chromatine, révélant ainsi une modification de l'activité de ce facteur de transcription. De plus, quand les souris auront atteint un âge où des différences seront visibles sur le nombre de plaquettes et la différenciation mégacaryocytaire, l'étude sur le lien entre CHK1 et NF-E2 pourra être poursuivie dans ces cellules primaires en comparant la localisation, l'activité ou le statut de phosphorylation de NF-E2 dans les échantillons de souris sauvages et hétérozygotes.

Grâce à notre étude phosphoprotéomique, nous avons identifié des sites potentiels de phosphorylation de NF-E2 par CHK1. Cette découverte se révèle particulièrement intéressante. En effet, les modifications post-traductionnelles sont essentielles dans la régulation de la stabilité, de la localisation ou de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription, mais concernant NF-E2, seuls quelques travaux décrivent ces modifications (Shyu et al., 2005 - Lee et al., 2008 - Lee et al., 2010b), et seulement 14 résidus sont rapportés sur le site Phospho Site Plus (Figure 68). L'identification d'un site de phosphorylation potentiel de NF-E2 sur la sérine 153 par CHK1 se révèle donc très intéressante dans notre étude, et il est maintenant indispensable de comprendre le rôle de cette phosphorylation. Grâce à la production de mutants de ce site de phosphorylation et à l'utilisation future d'un anticorps phospho-

spécifique, nous allons ainsi pouvoir vérifier si CHK1 phosphoryle NF-E2 sur ce site, et si elle favorise l'activité transcriptionnelle de NF-E2, comme nous le laissent envisager nos premiers résultats. Il sera ensuite essentiel d'étudier cette phosphorylation dans le contexte de la différenciation mégacaryocytaire, et notamment dans les progéniteurs murins sauvages ou hétérozygotes pour CHK1.

De manière plus générale et au-delà de nos travaux, l'identification d'un nouveau site de phosphorylation de NF-E2 représente un axe d'étude intéressant pour permettre une meilleure compréhension de la régulation de ce facteur de transcription, à la fois pour une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires fondamentaux, mais également dans un contexte clinique, notamment dans des maladies hématopoïétiques. Ce second point représente un challenge important puisque NF-E2 se révèle impliqué dans le développement des néoplasmes myéloprolifératifs. En effet, NF-E2 est notamment retrouvé surexprimé chez les patients atteints de polycythémia vera (PV), une pathologie caractérisée par une sur-production des érythrocytes et parfois des mégacaryocytes et des plaquettes, et la sévérité de cette maladie est apparemment corrélée au niveau de NF-E2 (Goerttle et al., 2005). De plus, des études ont mis en évidence que certains patients atteints de Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) présentent des mutations de NF-E2, et que des modèles de souris transgéniques sur-exprimant NF-E2 ou des mutations de ce facteur de transcription dans des cellules hématopoïétiques, développent des troubles myéloprolifératifs, avec l'apparition spontanée de LAM (Kaufmann et al., 2012 – Jutzi et al., 2019). Ces dernières études nous amènent à faire le lien avec nos travaux effectués précédemment sur le rôle de CHK1 dans la prolifération des LAM (David et al., 2016). En reliant ces différents travaux, et si notre hypothèse selon laquelle CHK1 phosphoryle NF-E2 sur la sérine 153 et régule ainsi son activité transcriptionnelle se confirme, des inhibiteurs de CHK1 pourraient être utilisés comme stratégie. Ainsi, en inhibant l'activité kinase de CHK1, la phosphorylation potentiellement activatrice de NF-E2 pourrait être diminuée dans ces troubles myéloprolifératifs.

Un autre objectif de ce travail était de déterminer plus précisément le rôle de CHK1 dans la différenciation mégacaryocytaire, suite aux travaux publiés par Boles et ses collaborateurs en 2010 et dans la continuité des résultats préliminaires obtenus par Laure David. En travaillant avec des modèles murins sauvages ou hétérozygotes pour CHK1 nous espérions, en plus d'observer un phénotype, pouvoir obtenir du matériel primaire afin de reproduire les profils de polyploïdisation précédemment obtenus par inhibition ou invalidation par shARN de CHK1 (résultats non publiés de Laure David) et de déterminer précisément le rôle de CHK1 dans cette différenciation. Malheureusement, pour l'heure aucun phénotype n'est visible sur ces souris, tant sur le nombre de plaquette que sur la capacité de polyploïdisation de ces progéniteurs.

D'après les travaux publiés par Boles et ses collaborateurs, la diminution du nombre de plaquettes et d'érythrocytes n'est visible que sur 30% des souris âgées de 52 semaines. Il semblerait donc que l'effet de l'haplo-insuffisance de CHK1 soit faible. Pourtant, les résultats préliminaires de Laure sur l'effet de

l'inhibition ou de l'invalidation de CHK1 sur la différenciation des cellules HEL ou des progéniteurs mégacaryocytes murins est significatif, et nous permet de maintenir notre hypothèse d'un rôle de CHK1 dans cette différenciation. L'allèle restant dans les souris hétérozygotes pour CHK1 semble donc suffisant pour préserver une bonne différenciation, au moins un temps. En effet, sur les souris hétérozygotes pour CHK1 que nous avons utilisées, nous pouvons voir que pendant les premiers mois de vie de la souris, aucune différence du niveau protéique de CHK1 n'est retrouvée entre les souris sauvages ou hétérozygotes pour CHK1, montrant que l'allèle restant est suffisant pour maintenir un niveau de CHK1 correct, et expliquant l'absence de phénotype. Pourtant, après 6 mois, une différence d'expression protéique de CHK1 est visible entre les souris, dû à une augmentation du niveau protéique de CHK1 chez les souris sauvages. Ainsi, nous révélons pour la première fois que CHK1 est régulée au cours du temps, et que son niveau protéique est augmenté avec l'âge.

Au vu de cette augmentation du niveau de la protéine CHK1 au cours du temps, il semblerait que le rôle de cette kinase soit d'autant plus nécessaire au cours du vieillissement. La question de la régulation de CHK1 se pose donc, pour tenter de comprendre comment et pourquoi l'expression de CHK1 est modifiée au cours du vieillissement.

Une hypothèse émise concernant l'augmentation de CHK1 au cours du temps peut être expliquée par la nécessité pour les cellules de se protéger contre le stress réplicatif. En effet, des études montrent, notamment dans les cellules souches hématopoïétiques murines, que le stress réplicatif est augmenté chez les souris âgées en comparaison aux jeunes (Beerman et al., 2014 – Flach et al., 2014). De manière intéressante, CHK1 est retrouvée plus fortement phosphorylée dans ces cellules hématopoïétiques murines, montrant une activation de la voie de réparation des dommages pour tenter de contrer l'augmentation de ce stress réplicatif. Ainsi, la cellule, voir même l'organisme, pourrait mettre en place des mécanismes de régulation du niveau protéique de CHK1, afin de se protéger du stress réplicatif. Dans ce sens, nous avons essayé d'évaluer le niveau de phosphorylation de H2AX et de CHK1 dans les échantillons d'organes de souris sauvages ou hétérozygotes pour CHK1. Malheureusement nous n'avons pas réussi à obtenir de signal clair en western blot sur les échantillons testés, ne nous permettant pas de conclure sur ce point. Il serait intéressant de reproduire l'étude par immunofluorescence, technique plus propice à l'étude des phosphorylations pour des cellules primaires.

Pour expliquer cette augmentation du niveau protéique de CHK1, un des mécanismes possible est *via* la dégradation par l'autophagie médiée par les chaperons (appelé CMA pour Chaperone-mediated autophagy). CHK1 est en effet régulée par cette autophagie, puisque des cellules déficientes pour la CMA présentent une accumulation de CHK1 nucléaire (Park et al., 2015). De manière très intéressante, cette autophagie s'avère diminuée avec le vieillissement (Cuervo et al., 2000). En effet, Cuervo et ses collaborateurs ont étudié le niveau de CMA dans des souris âgées de 3 mois *versus* des souris âgées de 22 mois, et ont montré que les lysosomes de souris âgées de 22 mois présentent un plus faible niveau d'autophagie médié par les protéines chaperonnes dans les cellules du foie. Il serait donc intéressant

d'étudier le niveau de CMA dans nos souris âgées de 6 mois pour voir si son niveau est diminué, expliquant l'accumulation de CHK1 chez les souris sauvages. Ainsi le mécanisme de régulation de CHK1 au cours du vieillissement pourrait être expliqué.

Enfin, le vieillissement des souris semble nécessaire afin d'obtenir un phénotype, et ceci a été un problème pour la bonne avancée de notre étude sur la caractérisation du rôle de CHK1 dans la différenciation mégacaryocytaire. Malgré tout, un résultat supplémentaire obtenu sur ces progéniteurs mégacaryocytaires murins, nous permet d'en apprendre un peu plus sur le rôle de CHK1 dans cette différenciation et d'émettre des hypothèses. En effet, après avoir purifié des progéniteurs mégacaryocytaires murins et induit en différenciation par la TPO, nous nous sommes aperçus que les mégacaryocytes matures n'exprimaient plus CHK1, tant pour les souris HT que WT (Figure 72).

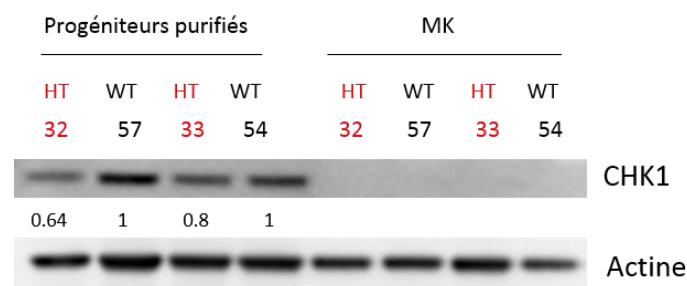


Figure 72 : Niveau d'expression de CHK1 dans les progéniteurs purifiés et les mégacaryocytes murins. Des progéniteurs mégacaryocytes ont été purifiés à partir de souris sauvages (WT) ou hétérozygotes (HT) pour CHK1 (échantillons de gauches). Les progéniteurs ont ensuite été induits en différenciation par un traitement à la TPO à 50ng/mL pendant 4 jours, et les mégacaryocytes différenciés (MK) ont été récupérés, puis analysés par Western Blot (échantillons de droite).

Ce résultat est particulièrement intéressant puisqu'il révèle pour la première fois que la protéine CHK1 n'est plus présente dans les mégacaryocytes matures. Ceci nous laisse imaginer un rôle de CHK1 plutôt précocément dans la différenciation des mégacaryocytes, et il serait nécessaire de reproduire ce résultat, notamment en le confirmant par une approche d'immunofluorescence. De plus, les résultats obtenus par Laure sur le potentiel de polyploïdisation des progéniteurs murins où CHK1 est inhibée, indiquent une augmentation du pourcentage de progéniteurs mégacaryocytaires avec un contenu en ADN de 2N ou 4N, au détriment des mégacaryocytes plus riches en ADN (contenu en ADN supérieur à 32N) (Figure 60). Il semblerait donc que l'inhibition de CHK1 induise un blocage assez précoce de la différenciation, potentiellement au début du processus de maturation nucléaire. Le facteur de transcription NF-E2 est quant à lui plutôt décrit pour intervenir au cours des étapes terminales de la mégacaryocytopoïèse et de la production des pro-plaquettes (Lecine et al., 1998). Ainsi, en plus de son rôle probable sur NF-E2, CHK1 pourrait éventuellement réguler un ou plusieurs autres partenaires, potentiellement impliqués dans les endomitoses

Pour poursuivre ce raisonnement, notre hypothèse est que la kinase PLK1 pourrait être également un partenaire de CHK1 impliquée dans la maturation nucléaire de ces cellules. La kinase PLK1 est requise pour le bon déroulement des endomitoses, puisqu'une ablation de *PLK1* dans les mégacaryocytes induit un défaut de polyploïdisation des cellules, avec une augmentation du pourcentage de cellule avec un contenu en ADN de 4 ou 8N, accompagné par un arrêt de mitose et une mort des cellules. PLK1 est en effet nécessaire à l'endomitose en assurant une bonne maturation des centrosomes et la formation d'un fuseau mitotique fonctionnel (Trakala et al., 2015). Au vu de l'importance de PLK1 dans le processus d'endomitose, et du nouveau rôle de CHK1 dans la régulation de PLK1 au cours de la mitose que nous avons publié (Cartel et al., 2018), le rôle de CHK1 dans la différenciation mégacaryocytaire pourrait passer par PLK1. En effet, dans le travail précédemment publié, nous mettons en évidence que la kinase PLK1 est une cible directe de CHK1 au cours de la mitose, en démontrant que l'invalidation ou l'inhibition de CHK1 diminue la phosphorylation activatrice sur la T210 de PLK1, et que ceci impacte la stabilité des substrats de PLK1 (Cartel et al., 2018). De manière intéressante, la phosphorylation de PLK1 par CHK1 nécessite la phosphorylation préalable de CHK1 en S280 par la kinase PIM2 (Cartel et al., 2018), et Laure David a justement mis en évidence au cours de sa thèse que CHK1 est phosphorylée sur la sérine 280 par les kinases PIM ou RSK dès 30 minutes après stimulation au PMA ou à la TPO des cellules HEL et progéniteurs murins (Figure 61). Avec l'ensemble de ces données, un modèle hypothétique est proposé où CHK1 serait phosphorylée sur la S280 au début de la différenciation mégacaryocytaire, permettant à la kinase de phosphoryler PLK1 sur son domaine activateur T210, permettant le déroulement des endomitoses. Il reste à déterminer si CHK1 doit également être phosphorylée en S280 pour phosphoryler NF-E2 sur la S153, pour permettre son activation et donc son rôle sur la production des plaquettes (Figure 73). Ainsi, la perte de CHK1 perturberait cette voie de signalisation, induisant un blocage de la polyploïdisation des progéniteurs mégacaryocytes dès le début de la maturation nucléaire. Avec ce modèle proposé, CHK1 agirait donc au moins à deux niveaux dans la différenciation mégacaryocytaire.

Ces études menées au cours de ma thèse révèlent de nouvelles informations sur CHK1, NF-E2 et la différenciation mégacaryocytaire, mais amènent également de nombreuses questions pouvant être le commencement de plusieurs études intéressantes.

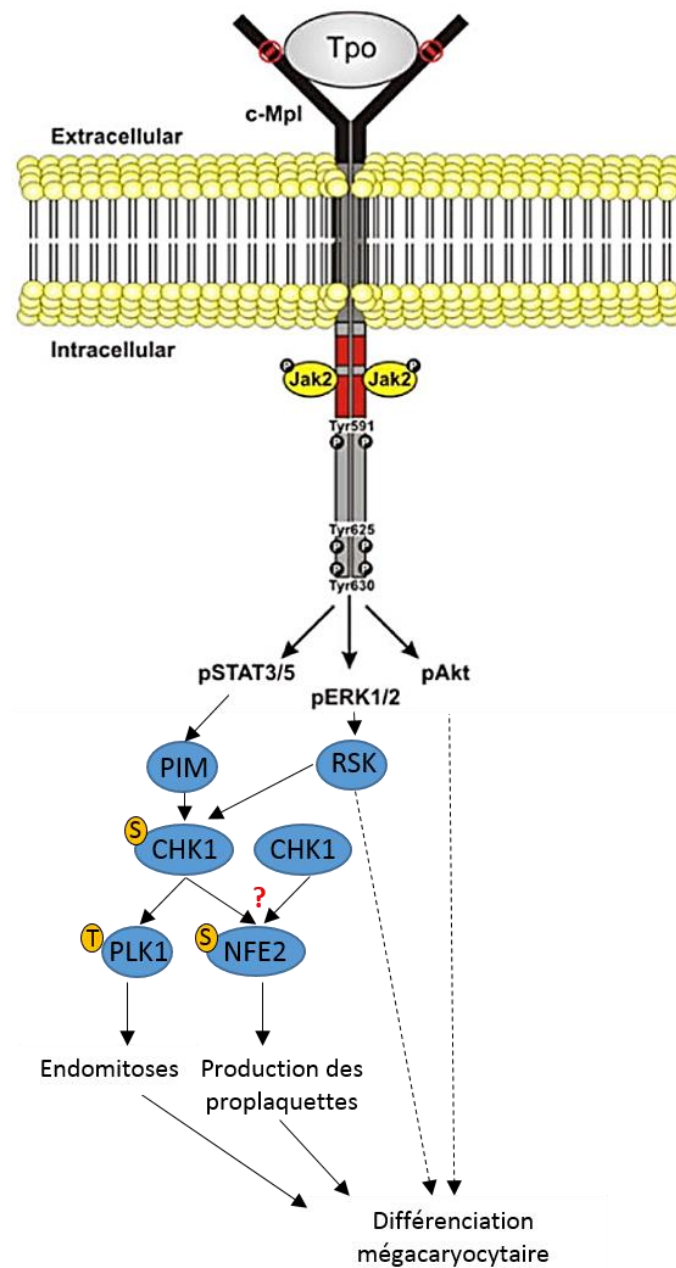


Figure 73 : Modèle proposé de la voie de signalisation impliquant CHK1 dans la différenciation mégacaryocytaire. Adapté de Geddis., 2010.

Discussion générale

Mes différents travaux de thèse mettent en lumière des rôles et des régulations de CHK1, à la fois dans un contexte cellulaire « normal » lors de la mitose et de la différenciation mégacaryocytaire, et dans un contexte pathologique dans le cas des Leucémies Aiguës Myéloïdes. L'ensemble de mes résultats permettent ainsi une meilleure compréhension de l'implication de CHK1 dans ce système hématopoïétique.

Un point commun relie tout de même l'ensemble de ces travaux, au-delà de CHK1 : la mitose.

En effet, en tant que régulateur du cycle cellulaire, le rôle de CHK1 dans l'entrée en mitose et dans le contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique est décrit, *via* ses partenaires tels que Aurora B, les protéines du Spindle Assembly Checkpoint (SAC), ou, comme montré notamment par nos travaux, *via* la kinase PLK1. De manière très intéressante, USP7 a également été retrouvée impliquée dans la régulation de la mitose *via* des partenaires communs de CHK1, dont les protéines du SAC et PLK1.

Afin d'élargir ce travail, la question qui peut être posée est si ces trois protéines, USP7-CHK1-PLK1, n'agiraient pas ensemble dans la régulation de la mitose, et donc dans le processus de différenciation mégacaryocytaire *via* la régulation des endomitoses.

En effet, nous avons décrit qu'au cours de la mitose CHK1 phosphorylée en S280 est capable de phosphoryler PLK1 sur la T210, régulant son activation (Cartel et al., 2018). Une fois activée, PLK1 va pouvoir phosphoryler ses substrats dont 53BP1 sur la S380, permettant sa stabilisation *via* son interaction avec USP7, permettant ainsi le maintien d'un nombre correct de centrosomes (Yim et al., 2017). Dans ce contexte, USP7 pourrait à son tour stabiliser CHK1, permettant ainsi de former une boucle de régulation (Figure 74). Il serait donc intéressant d'étudier si USP7 régule CHK1 au cours de la mitose, en étudiant également leurs localisations respectives dans les différentes étapes de la mitose. Ensemble ces protéines pourraient assurer conjointement le bon déroulement d'une mitose normale.

Il serait par la suite intéressant de déterminer si USP7 peut avoir un rôle dans la différenciation mégacaryocytaire. Des papiers révèlent déjà son rôle dans des mécanismes de différenciation et très récemment, une étude a justement étudié l'implication d'USP7 dans la différenciation érythrocytaire (Liang et al., 2019). Il s'avère que le rôle d'USP7 dans cette différenciation a lieu tardivement et *via* la régulation de la stabilité du facteur GATA1, mais il n'est pas exclu qu'USP7 puisse avoir un rôle également dans la différenciation mégacaryocytaire, possiblement *via* son rôle décrit dans la mitose.

La différenciation des mégacaryocytes étant caractérisée par des mitoses « incomplètes », appelées endomitoses, une régulation fine et particulière de ces mitoses est nécessaire. Ainsi, des modifications des niveaux de USP7, de CHK1 ou de PLK1 pourraient perturber le bon déroulement des premières

étapes des endomitoses, possiblement *via* leurs rôles sur le maintien du nombre de centrosomes, induisant un blocage dans les étapes précoces de la maturation nucléaire des mégacaryocytes.

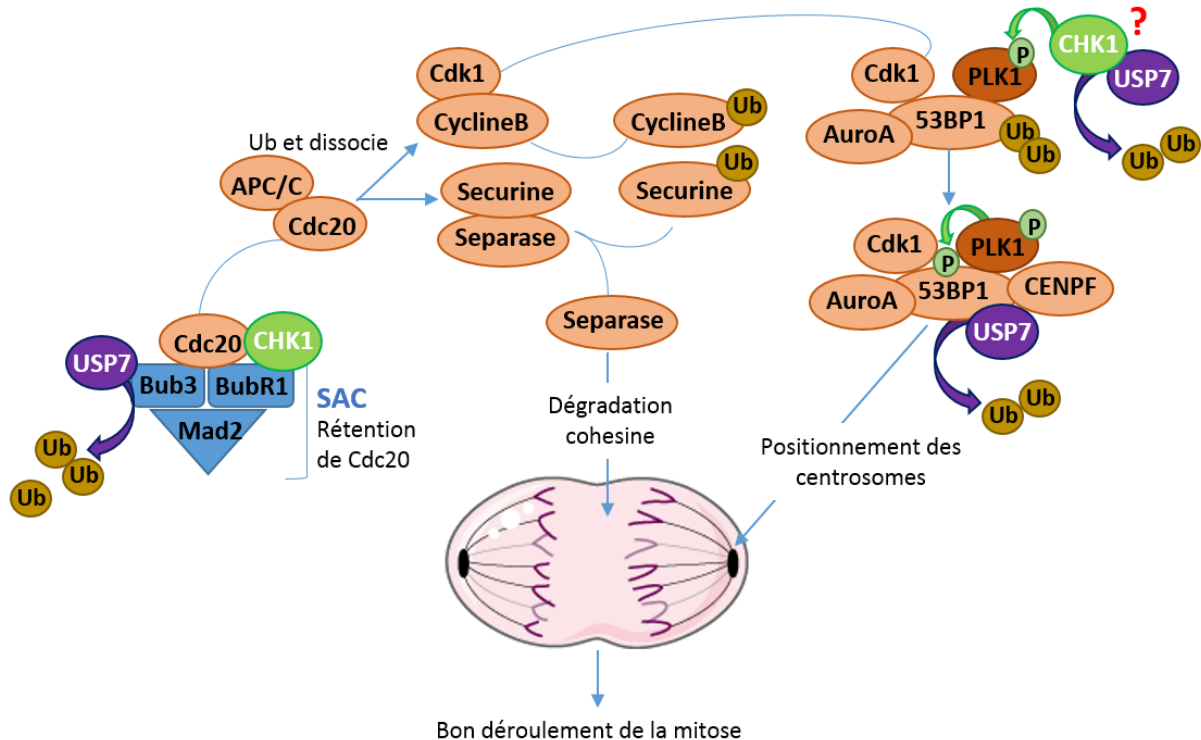


Figure 74 : Modèle des rôles associés de CHK1, USP7 et PLK1 dans la mitose. Grâce aux résultats obtenus et aux données de la littérature, l'hypothèse d'une implication conjointe de USP7, CHK1 et PLK1 dans la différenciation est émise.

Si cette hypothèse se vérifie et que ces trois partenaires agissent conjointement dans la différenciation mégacaryocytaire, la question de leur implication plus globale au cours la différenciation hématopoïétique normale se pose, mais également dans le contexte d'un blocage de la différenciation comme cela est le cas dans les LAM. En effet, la dérégulation d'USP7, CHK1 et PLK1 retrouvée dans ces cellules (travaux de thèse – David et al., 2016 - Moison et al., 2019), pourrait éventuellement participer à la perturbation de la différenciation de ces blastes, notamment pour les LAM Erythroblastiques et Mégacaryoblastiques. Bien que mes premiers résultats obtenus sur l'impact de l'inhibition d'USP7, pour la reprise de la différenciation des blastes, soient négatifs sur les lignées cellulaires et lors de l'expérience *in vivo* de PDX, cette question reste, d'après moi, réellement intéressante. En effet, en plus de contrer la résistance au traitement, la reprise de la différenciation de ces cellules est un véritable enjeu dans le traitement des LAM. Il serait donc nécessaire de poursuivre ce travail, peut être en focalisant l'étude sur des échantillons primaires de patients atteints de certains types de LAM (LAM 6 Erythroblastiques ou LAM 7 Mégacaryoblastiques).

Pour finir, un dernier point reste intéressant à discuter, n'ayant pas été abordé précédemment, sur le lien potentiel existant entre l'axe USP7-CHK1, la réplication et la résistance des LAM.

Dans les travaux princeps publiés, Laure David montre qu'un fort niveau protéique de CHK1 permet aux cellules de LAM de contrecarrer l'état de stress réplicatif instauré par un traitement à l'AraC, *via* la réparation des dommages de l'ADN et en facilitant l'activation et/ou la progression des fourches de réplication (David et al., 2016). De manière intéressante, Lecona et ses collaborateurs ont montré que USP7 est enrichie aux sites de réplication de l'ADN, et est nécessaire pour la progression des fourches de réplication et l'allumage de nouvelles origines de réplication dans des cellules de cancer du côlon, en régulant la SUMOylation et l'ubiquitylation des protéines sur la chromatine mature (Lecona et al., 2016). Ainsi, il serait intéressant de déterminer si USP7 régule CHK1, et/ou si les deux protéines agissent conjointement, au niveau de la chromatine pour réguler la réplication face à un stress réplicatif induit par un traitement à l'AraC, permettant ainsi la chimiorésistance de ces cellules leucémiques en passant outre les dommages à l'ADN.

Ensemble, les études effectuées pendant ma thèse permettent de mieux comprendre certains mécanismes de régulation de l'hématopoïèse normale et leucémique, et ouvrent de nouvelles hypothèses sur des rôles de CHK1 et d'USP7 dans ces contextes.

Références bibliographiques

- Agathangelou A, Smith E, Davies NJ, Kwok M, Zlatanou A, Oldreive CE, Mao J, Da Costa D, Yadollahi S, Perry T, Kearns P, Skowronska A, Yates E, Parry H, Hillmen P, Reverdy C, Delansorne R, Paneesha S, Pratt G, Moss P, Taylor AMR, Stewart GS, Stankovic T. (2017) USP7 inhibition alters homologous recombination repair and targets CLL cells independently of ATM/p53 functional status. *Blood*. 130(2):156-166.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 404(6774):193-7.
- Alonso-de Vega I., Martin Y., Smith V.AJ. (2014) USP7 controls CHK1 protein stability by direct deubiquitination. *Cell Cycle*. 13 :24,3921-3926.
- Altun M, Kramer HB, Willems LI, McDermott JL, Leach CA, Goldenberg SJ, Kumar KG, Konietzny R, Fischer R, Kogan E, Mackeen MM, McGouran J, Khoronenkova SV, Parsons JL, Dianov GL, Nicholson B, Kessler BM. (2011) Activity-based chemical proteomics accelerates inhibitor development for deubiquitylating enzymes. *Chem Biol*. 18(11):1401-12.
- Amerik A.Y., Hochstrasser M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *BBA molecular cell research*.1695, 189-207.
- Andrews NC. (1998) The NF-E2 transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol*. 30(4):429-32.
- Arata Y, Fujita M, Ohtani K, Kijima S, Kato JY. (2000) Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *J Biol Chem*. 275(9):6337-45.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 127(20):2391-405.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 444(7120):756-60.
- Bartucci M, Svensson S, Romania P, Dattilo R, Patrizii M, Signore M, Navarra S, Lotti F, Biffoni M, Pilozi E, Duranti E, Martinelli S, Rinaldo C, Zeuner A, Maugeri-Saccà M, Eramo A, De Maria R. (2012) Therapeutic targeting of Chk1 in NSCLC stem cells during chemotherapy. *Cell Death Differ*. 19(5):768-78.
- Basu B, Saha G, Choudhury SG, Ghosh MK. (2017) Cellular homeostasis or tumorigenesis: USP7 playing the double agent. *Cancer Cell Microenv*. 4: e1624
- Bhattacharya S, Ghosh MK. (2014) HAUSP, a novel deubiquitinase for Rb - MDM2 the critical regulator. *FEBS J*. 281(13):3061-78.
- Bhattacharya S, Chakraborty D, Basu M, Ghosh MK. (2018) Emerging insights into HAUSP (USP7) in physiology, cancer and other diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 29;3:17.
- Blair P, Flaumenhaft R. (2009) Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 23(4):177-89.
- Becker K, Marchenko ND, Palacios G, Moll UM. (2008) A role of HAUSP in tumor suppression in a human colon carcinoma xenograft model. *Cell Cycle*. 1;7(9):1205-13.

- Beerman I, Seita J, Inlay MA, Weissman IL, Rossi DJ. (2014) Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell*. 15(1):37-50.
- Bertoli C, Klier S, McGowan C, Wittenberg C, de Bruin RA. (2013) Chk1 inhibits E2F6 repressor function in response to replication stress to maintain cell-cycle transcription. *Curr Biol*. 23(17):1629-37.
- Bertoli S, Récher C. (2018) Nouvelles thérapies ciblées dans les leucémies aiguës myéloïdes. *Journal de Biologie Médicale/ Volume 7-Numéro 25 / Avr-Juin 2018*.
- Bertoni F, Codegoni AM, Furlan D, Tibiletti MG, Capella C, Broggin M. (1999) CHK1 frameshift mutations in genetically unstable colorectal and endometrial cancers. *Genes Chromosomes Cancer*. 26(2):176-80.
- Bie (de) P, Zaaroor-Regev D, Ciechanover A. (2010) Regulation of the Polycomb protein RING1B ubiquitination by USP7. *Biochem Biophys Res Commun*. 400(3):389-95.
- Biswas K, Philip S, Yadav A, Martin BK, Burkett S, Singh V, Babbar A, North SL, Chang S, Sharan SK. (2018) BRE/BRCC45 regulates CDC25A stability by recruiting USP7 in response to DNA damage. *Nat Commun*. 9(1):537.
- Boles NC, Peddibhotla S, Chen AJ, Goodell MA, Rosen JM. (2010) Chk1 haploinsufficiency results in anemia and defective erythropoiesis. *PLoS One*. 5(1):e8581.
- Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*. 317(5845):1760-4.
- Boudny M, Zemanova J, Khirsariya P, Borsky M, Verner J, Cerna J, Oltova A, Seda V, Mraz M, Jaros J, Jaskova Z, Spunarova M, Brychtova Y, Soucek K, Drapela S, Kasparkova M, Mayer J, Paruch K, Trbusek M. (2019) Novel CHK1 inhibitor MU380 exhibits significant single-agent activity in TP53-mutated chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. pii: haematol.203430.
- Brenner AK, Reikvam H, Lavecchia A, Bruserud Ø. (2014) Therapeutic targeting the cell division cycle 25 (CDC25) phosphatases in human acute myeloid leukemia--the possibility to target several kinases through inhibition of the various CDC25isoforms. *Molecules*. 19(11):18414-47.
- Bryant C, Scriven K, Massey AJ. (2014) Inhibition of the checkpoint kinase Chk1 induces DNA damage and cell death in human Leukemia and Lymphoma cells. *Mol Cancer*. 13:147.
- Cai JB, Shi GM, Dong ZR, Ke AW, Ma HH, Gao Q, Shen ZZ, Huang XY, Chen H, Yu DD, Liu LX, Zhang PF, Zhang C, Hu MY, Yang LX, Shi YH, Wang XY, Ding ZB, Qiu SJ, Sun HC, Zhou J, Shi YG, Fan J. (2015) Ubiquitin-specific protease 7 accelerates p14(ARF) degradation by deubiquitinating thyroid hormone receptor-interacting protein 12 and promotes hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology*. 61(5):1603-14.
- Cai L, Li J, Zhao J, Guo Y, Xie M, Zhang X, Wang L, Tian H, Li A, Li Q, Miao Y. (2019) Fbxo6 confers drug-sensitization to cisplatin via inhibiting the activation of Chk1 in non-small cell lung cancer. *FEBS Lett*.
- Cantor AB, Orkin SH. (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*. 21(21):3368-76.

- Carrà G, Panuzzo C, Torti D, Parvis G, Crivellaro S, Familiari U, Volante M, Morena D, Lingua MF, Brancaccio M, Guerrasio A, Pandolfi PP, Saglio G, Taulli R, Morotti A. (2017) Therapeutic inhibition of USP7-PTEN network in chronic lymphocytic leukemia: a strategy to overcome TP53 mutated/deleted clones. *Oncotarget*. 8(22):35508-35522.
- Carrassa L, Broggin M, Vikhanskaya F, Damia G. (2003) Characterization of the 5'flanking region of the human Chk1 gene: identification of E2F1 functional sites. *Cell Cycle*. 2(6):604-9.
- Carrassa L, Sanchez Y, Erba E, Damia G. (2009) U2OS cells lacking Chk1 undergo aberrant mitosis and fail to activate the spindle checkpoint. *J Cell Mol Med*. 13(8A):1565-76.
- Carrassa L, Montelatici E, Lazzari L, Zangrossi S, Simone M, Broggin M, Damia G. (2010) Role of Chk1 in the differentiation program of hematopoietic stem cells. *Cell Mol Life Sci*. 67(10):1713-22.
- Cartel M, Adam K, Lambert M, David L, Yuan L, Besson A, Mayeux P, Manenti S, Didier C. (2018) A PIM-CHK1 signaling pathway regulates PLK1 phosphorylation and function during mitosis. *J Cell Sci*. 131(15). pii: jcs213116.
- Cavelier C, Didier C, Prade N, Mansat-De Mas V, Manenti S, Recher C, Demur C, Ducommun B. (2009) Constitutive activation of the DNA damage signaling pathway in acute myeloid leukemia with complex karyotype: potential importance for checkpoint targeting therapy. *Cancer Res*. 69(22):8652-61.
- Chamoun K, Borthakur G. (2018) Investigational CHK1 inhibitors in early stage clinical trials for acute myeloid leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 1-6.
- Chauhan D, Tian Z, Nicholson B, Kumar KG, Zhou B, Carrasco R, McDermott JL, Leach CA, Fulciniti M, Kodrasov MP, Weinstock J, Kingsbury WD, Hideshima T, Shah PK, Minvielle S, Altun M, Kessler BM, Orlowski R, Richardson P, Munshi N, Anderson KC. (2012) A small molecule inhibitor of ubiquitin-specific protease-7 induces apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes bortezomib resistance. *Cancer Cell*. 22(3):345-58.
- Chen Y, Sanchez Y. (2004) Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair (Amst)*. 3(8-9):1025-32.
- Cheng YC, Lin TY, Shieh SY. (2013a) Candidate tumor suppressor BTG3 maintains genomic stability by promoting Lys63-linked ubiquitination and activation of the checkpoint kinase CHK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(15):5993-8.
- Cheng C, Niu C, Yang Y, Wang Y, Lu M. (2013b) Expression of HAUSP in gliomas correlates with disease progression and survival of patients. *Oncol Rep*. 29(5):1730-6.
- Cheng YC, Shieh SY. (2018) Deubiquitinating enzyme USP3 controls CHK1 chromatin association and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115(21):5546-5551.
- Cheon K.W., Baek K.H. (2006) HAUSP as a therapeutic target for hematopoietic tumors. *Int J Oncol*. 28, 1209-1215.
- Ciemerych MA, Sicinski P. (2005) Cell cycle in mouse development. *Oncogene*. 24(17):2877-98.
- Colland F, Formstecher E, Jacq X, Reverdy C, Planquette C, Conrath S, Trouplin V, Bianchi J, Aushev VN, Camonis J, Calabrese A, Borg-Capra C, Sippl W, Collura V, Boissy G, Rain JC, Guedat P, Delansorne R, Daviet L. (2009) Small-

molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells. *Mol Cancer Ther.* 8(8):2286-95.

Colleran A, Collins PE, O'Carroll C, Ahmed A, Mao X, McManus B, Kiely PA, Burstein E, Carmody RJ. (2013) Deubiquitination of NF- κ B by Ubiquitin-Specific Protease-7 promotes transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(2):618-23.

Cooper GM. (2000) *The Cell: A Molecular Approach - The Eukaryotic Cell Cycle* (2nd edition). Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Coux O., Tanaka K., Goldberg AL. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem.* 65; 801-847.

Coux O., Aillet F., Baldin V., Belgareh N., Bernis C., Biard-Piechaczyk M., Bonne-Andrea C., Bossis G., Castro A., Colland F., Daviet L., Dejean A., Desagher S., Espert L., Farras R., Ferreira T., Friguet B., Ghysdael J., Haguenaer-Tsapis R., Jariel-Encontre I., Lang V., Laplantine E., Le Cam L., Le Tallec B., Léon S., Linares L., Lorca T., Maragno A., Martin N., Merlet J., Morris M., Peyroche A., Piechaczyk M., Pintard L., Reboud-Ravaux M., Rodriguez M., Sagnier S., Tempé D., Tran Quang C., Urban-Grimal D. (2011) *Protéasome, ubiquitine et protéins apparentées à l'ubiquitine*. Paris : Editions TEC et DOC, 482 pages.

Cuervo AM, Dice JF. (2000) Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem.* 275(40):31505-13.

Datta NS, Williams JL, Caldwell J, Curry AM, Ashcraft EK, Long MW. (1996) Novel alterations in CDK1/cyclin B1 kinase complex formation occur during the acquisition of a polyploid DNA content. *Mol Biol Cell.* 7(2):209-23.

Daubeuf S, Singh D, Tan Y, Liu H, Federoff HJ, Bowers WJ, Tolba K. (2009) HSV ICP0 recruits USP7 to modulate TLR-mediated innate response. *Blood.* 113(14):3264-75.

David L. (2016) Etude des nouvelles fonctions de la protéine Checkpoint kinase 1 (CHK1) au cours de la différenciation myéloïde normale et leucémique. Thèse de doctorat (Université Toulouse 3 Paul Sabatier).

David L, Fernandez-Vidal A, Bertoli S, Grgurevic S, Lepage B, Deshaies D, Prade N, Cartel M, Larrue C, Sarry JE, Delabesse E, Cazaux C, Didier C, Récher C, Manenti S, Hoffmann JS. (2016) CHK1 as a therapeutic target to bypass chemoresistance in AML. *Sci Signal.* 9(445):ra90.

Deveaux S, Cohen-Kaminsky S, Shivdasani RA, Andrews NC, Filipe A, Kuzniak I, Orkin SH, Roméo PH, Mignotte V. (1997) p45 NF-E2 regulates expression of thromboxane synthase in megakaryocytes. *EMBO J.* 16(18):5654-61.

DiNardo CD, Cortes JE. (2016) Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016(1):348-355.

Di Tullio A, Rouault-Pierre K, Abarrategi A, Mian S, Grey W, Gribben J, Stewart A, Blackwood E, Bonnet D. (2017) The combination of CHK1 inhibitor with G-CSF overrides cytarabine resistance in human acute myeloid leukemia. *Nat Commun.* 8(1):1679.

Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. (2015) Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 373(12):1136-52.

- Donzelli M, Draetta GF. (2003) Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep.* 4(7):671-7.
- Eisbacher M, Holmes ML, Newton A, Hogg PJ, Khachigian LM, Crossley M, Chong BH. (2003) Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding. *Mol Cell Biol.* 23(10):3427-41.
- Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. (2003) RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood.* 101(11):4333-41.
- (den) Elzen NR, O'Connell MJ. (2004) Recovery from DNA damage checkpoint arrest by PP1-mediated inhibition of Chk1. *EMBO J.* 23(4):908-18.
- Emptage RP, Schoenberger MJ, Ferguson KM, Marmorstein R. (2017) Intramolecular autoinhibition of checkpoint kinase 1 is mediated by conserved basic motifs of the C-terminal kinase-associated 1 domain. *J Biol Chem.* 292(46):19024-19033.
- Enomoto M, Goto H, Tomono Y, Kasahara K, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M. (2009) Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition. *J Biol Chem.* 284(49):34223-30.
- Erba HP, Becker PS, Shami PJ, Grunwald MR, Flesher DL, Zhu M, Rasmussen E, Henary HA, Anderson AA, Wang ES. (2019) Phase 1b study of the MDM2 inhibitor AMG 232 with or without trametinib in relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 3(13):1939-1949.
- Everett RD., Meredith M., Orr A., Cross A., Kathoria M., Parkinson J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO. J.* 16, 1519-1530.
- Faesen AC., Dirac A.MG., Shanmugham A., Ovaa H., Perrakis A., Sixma TK. (2011). Mechanisme of USP7/HAUSP activation by its C-terminal ubiquitin-like domain and allosteric regulation by GMP-synthetase. *Mol Cell.* 44, 147-159.
- Fan YH, Cheng J, Vasudevan SA, Dou J, Zhang H, Patel RH, Ma IT, Rojas Y, Zhao Y, Yu Y, Zhang H, Shohet JM, Nuchtern JG, Kim ES, Yang J. (2013) USP7 inhibitor P22077 inhibits neuroblastoma growth via inducing p53-mediated apoptosis. *Cell Death Dis.* 4:e867.
- Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, Bosc C, Sugita M, Stuani L, Fraisse M, Scotland S, Larrue C, Boutzen H, Féliu V, Nicolau-Travers ML, Cassant-Sourdy S, Broin N, David M, Serhan N, Sarry A, Tavitian S, Kaoma T, Vallar L, Iacovoni J, Linares LK, Montersino C, Castellano R, Griessinger E, Collette Y, Duchamp O, Barreira Y, Hirsch P, Palama T, Gales L, Delhommeau F, Garmy-Susini BH, Portais JC, Vergez F, Selak M, Danet-Desnoyers G, Carroll M, Récher C, Sarry JE. (2017) Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* 7(7):716-735
- Faustrup H, Bekker-Jensen S, Bartek J, Lukas J, Mailand N. (2009) USP7 counteracts SCF β TrCP- but not APC Cdh1 -mediated proteolysis of Claspin. *J Cell Biol.* 184(1):13-9.
- Felle M, Joppien S, Németh A, Diermeier S, Thalhammer V, Dobner T, Kremmer E, Kappler R, Längst G. (2011) The USP7/Dnmt1 complex stimulates the DNA methylation activity of Dnmt1 and regulates the stability of UHRF1. *Nucleic Acids Res.* 39(19):8355-65.

- Fernandez-Montalvan A., Bouwmeester T., Joberty G., Mader R., Mahnke M., Pierrat B., Schlaeppi JM., Worpenberg S., Gerhart B. (2007) Biochemical characterization of USP7 reveals post-translational modification sites and structural requirements for substrate processing and subcellular localization. *FEBS J.* 274(16):4256-70.
- Fishler T, Li YY, Wang RH, Kim HS, Sengupta K, Vassilopoulos A, Lahusen T, Xu X, Lee MH, Liu Q, Elledge SJ, Ried T, Deng CX. (2010) Genetic instability and mammary tumor formation in mice carrying mammary-specific disruption of Chk1 and p53. *Oncogene.* 29(28):4007-17.
- Flach J, Bakker ST, Mohrin M, Conroy PC, Pietras EM, Reynaud D, Alvarez S, Diolaiti M, Ugarte F, Forsberg EC, Le Beau MM, Stohr BA, Méndez J, Morrison CG, Passequé E. (2014) *Nature.* 512(7513):198-202.
- Forment JV, Blasius M, Guerini I, Jackson SP. (2011) Structure-specific DNA endonuclease Mus81/Eme1 generates DNA damage caused by Chk1 inactivation. *PLoS One.* 6(8):e23517.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X. and Ronai, Z. (1998) Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17, 2543–2547
- Fujita R, Takayama-Tsujimoto M, Satoh H, Gutiérrez L, Aburatani H, Fujii S, Sarai A, Bresnick EH, Yamamoto M, Motohashi H. (2013) NF-E2 p45 is important for establishing normal function of platelets. *Mol Cell Biol.* 33(14):2659-70.
- Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M, Nishida E. (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature.* 390(6657):308-11.
- Fuse E, Tani H, Kurata N, Kobayashi H, Shimada Y, Tamura T, Sasaki Y, Tanigawara Y, Lush RD, Headlee D, Figg WD, Arbuck SG, Senderowicz AM, Sausville EA, Akinaga S, Kuwabara T, Kobayashi S. (1998) Unpredicted clinical pharmacology of UCN-01 caused by specific binding to human alpha1-acid glycoprotein. *Cancer Res.* 58(15):3248-53.
- García P, Calés C. (1996) Endoreplication in megakaryoblastic cell lines is accompanied by sustained expression of G1/S cyclins and downregulation of cdc25C. *Oncogene.* 13(4):695-703.
- Gasiorek JJ, Blank V. (2015) Regulation and function of the NFE2 transcription factor in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Cell Mol Life Sci.* 72(12):2323-35.
- Geddis AE, Fox NE, Tkachenko E, Kaushansky K. (2007) Endomitotic megakaryocytes that form a bipolar spindle exhibit cleavage furrow ingression followed by furrow regression. *Cell Cycle.* 6(4):455-60.
- Geddis AE. (2010) Megakaryopoiesis. *Semin Hematol.* 47(3):212-9.
- Georges A, Coyaud E, Marcon E, Greenblatt J, Raught B, Frappier L. (2019) USP7 Regulates Cytokinesis through FBXO38 and KIF20B. *Sci Rep.* 9(1):2724.
- Giovinazzi S, Morozov VM, Summers MK, Reinhold WC, Ishov AM. (2013) USP7 and Daxx regulate mitosis progression and taxane sensitivity by affecting stability of Aurora-A kinase. *Cell Death Differ.* 20(5):721-31.
- Giovinazzi S, Sirleto P, Aksenova V, Morozov VM, Zori R, Reinhold WC, Ishov AM. (2014) Usp7 protects genomic stability by regulating Bub3. *Oncotarget.* 5(11):3728-42.

- Glutzer M. (2009) The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(1):9-20.
- Goerttler PS, Kreutz C, Donauer J, Faller D, Maiwald T, März E, Rumberger B, Sparna T, Schmitt-Gräff A, Wilpert J, Timmer J, Walz G, Pahl HL. (2005) Gene expression profiling in polycythaemia vera: overexpression of transcription factor NF-E2. *Br J Haematol.* 129(1):138-50.
- Gong EY, Smits VAJ, Fumagallo F, Piscitello D, Morrice N, Freire R, Gillespie DA. (2015) KA1-targeted regulatory domain mutations activate Chk1 in the absence of DNA damage. *Sci Rep.* 5:10856.
- Gong EY, Hernández B, Nielsen JH, Smits VAJ, Freire R, Gillespie DA. (2018) Chk1 KA1 domain auto-phosphorylation stimulates biological activity and is linked to rapid proteasomal degradation. *Sci Rep.* 8(1):17536.
- González Besteiro MA, Gottifredi V. (2015) The fork and the kinase: a DNA replication tale from a CHK1 perspective. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 763:168-80.
- Gordge MP. (2005) Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals. *Br J Pharmacol.* 145(3):271-3.
- Goto H, Izawa I, Li P, Inagaki M. (2012) Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Sci.* 103(7):1195-200.
- Goto H, Natsume T, Kanemaki MT, Kaito A, Wang S, Gabazza EC, Inagaki M, Mizoguchi A. (2019) Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell cycle progression. *J Cell Sci.* 132(2).
- Goudelock DM, Jiang K, Pereira E, Russell B, Sanchez Y. (2003) Regulatory interactions between the checkpoint kinase Chk1 and the proteins of the DNA-dependent protein kinase complex. *J Biol Chem.* 278(32):29940-7.
- Gottifredi V, Karni-Schmidt O, Shieh SS, Prives C. (2001) p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* 21(4):1066-76.
- Grote D, Moison C, Duhamel S, Chagraoui J, Girard S, Yang J, Mayotte N, Coulombe Y, Masson JY, Brown G, Meloche S, Sauvageau G. (2015) E4F1 is a master regulator of CHK1-mediated functions, *Cell report* 11 : 1-10.
- Groth A, Lukas J, Nigg EA, Silljé HH, Wernstedt C, Bartek J, Hansen K. (2003) Human Toslled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint. *EMBO J.* 22(7):1676-87.
- Guervilly JH, Renaud E, Takata M, Rosselli F. (2011) USP1 deubiquitinase maintains phosphorylated CHK1 by limiting its DDB1-dependent degradation. *Hum Mol Genet.* 20(11):2171-81.
- Guo Z, Kumagai A, Wang SX, Dunphy WG. (2000) Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* 14(21):2745-56.
- Guo C, Kumagai A, Schlacher K, Shevchenko A, Shevchenko A, Dunphy WG. (2015) Interaction of Chk1 with Treslin negatively regulates the initiation of chromosomal DNA replication. *Mol Cell.* 57(3):492-505.
- Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. (1994) Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science.* 265(5177):1445-7.

- Guzi TJ, Paruch K, Dwyer MP, Labroli M, Shanahan F, Davis N, Taricani L, Wiswell D, Seghezzi W, Penaflor E, Bhagwat B, Wang W, Gu D, Hsieh Y, Lee S, Liu M, Parry D. (2011) Targeting the replication checkpoint using SCH 900776, a potent and functionally selective CHK1 inhibitor identified via high content screening. *Mol Cancer Ther.* 10(4):591-602.
- Hadari T., Warms JV., Rose IA., Hershko A. (1992). A ubiquitin C-terminal isopeptidase that acts on polyubiquitin chains. Role in protein degradation. *J Biol Chem.* 267, 719-727.
- Halder S, Torrecilla I, Burkhalter MD, Popović M, Fielden J, Vaz B, Oehler J, Pilger D, Lessel D, Wiseman K, Singh AN, Vendrell I, Fischer R, Philipp M, Ramadan K. (2019) SPRTN protease and checkpoint kinase 1 cross-activation loop safeguards DNA replication. *Nat Commun.* 10(1):3142.
- Han X, Tang J, Wang J, Ren F, Zheng J, Gragg M, Kiser P, Park PS, Palczewski K, Yao X, Zhang Y. (2016) Conformational Change of Human Checkpoint Kinase 1 (Chk1) Induced by DNA Damage. *J Biol Chem.* 291(25):12951-9.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-74.
- Harrigan JA, Jacq X, Martin NM, Jackson SP. (2018) Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 17(1):57-78.
- Hassepass I, Voit R, Hoffmann I. (2003) Phosphorylation at serine 75 is required for UV-mediated degradation of human Cdc25A phosphatase at the S-phase checkpoint. *J Biol Chem.* 278(32):29824-9.
- Hematocell.fr [en ligne]. Laboratoire d'hématologie du CHU d'Anger, Mai 2016. [consulté le 13/06/2019]. Disponible sur <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologie-generale/28-leucemies-aigues-myeloides>
- Hernández-Pérez S, Cabrera E, Salido E, Lim M, Reid L, Lakhani SR, Khanna KK, Saunus JM, Freire R. (2017) DUB3 and USP7 de-ubiquitinating enzymes control replication inhibitor Geminin: molecular characterization and associations with breast cancer. *Oncogene.* 36(33):4817.
- Hicke L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 195-201.
- Hitchcock IS, Kaushansky K. (2014) Thrombopoietin from beginning to end. *Br J Haematol.* 165(2):259-68.
- Hochstrasser M. (1996) Ubiquitin-Dependent protein degradation. *Annu Rev Genet.* 30, 405-439.
- Höglund A, Nilsson LM, Muralidharan SV, Hasvold LA, Merta P, Rudelius M, Nikolova V, Keller U, Nilsson JA. (2011) Therapeutic implications for the induced levels of Chk1 in Myc-expressing cancer cells. *Clin Cancer Res.* 17(22):7067-79.
- Holowaty MN, Zeghouf M, Wu H, Tellam J, Athanasopoulos V, Greenblatt J, Frappier L. (2003 a) Protein profiling with Epstein-Barr nuclear antigen-1 reveals an interaction with the herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease HAUSP/USP7. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):29987-94.
- Holowaty M.N., Sheng Y., Nguyen T., Arrowsmith C., Frappier L. (2003 b) Protein interaction domains of the ubiquitin-specific protease USP7/HAUSP. *J Biol Chem.* 278, 47753-47761.
- Hospital MA, Jacquelin A, Mazed F, Saland E, Larrue C, Mondesir J, Birsén R, Green AS, Lambert M, Sujobert P, Gautier EF, Salnot V, Le Gall M, Decroocq J, Poulain L, Jacque N, Fontenay M, Kosmider O, Récher C, Auberger P, Mayeux P, Bouscary D, Sarry JE, Tamburini J. (2018) RSK2 is a new Pim2 target with pro-survival functions in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 32(3):597-605.

- Hu M, Gu L, Li M, Jeffrey PD, Gu W, Shi Y. (2006) Structural basis of competitive recognition of p53 and MDM2 by HAUSP/USP7: implications for the regulation of the p53-MDM2 pathway. *PLoS Biol.* 4(2):e27.
- Hu W, Zong Q, John-Baptiste A, Jessen B. (2011) Transient knock down of checkpoint kinase 1 in hematopoietic progenitors is linked to bone marrow toxicity. *Toxicol Lett.* 204(2-3):141-7.
- Hu HJ, Zhang LG, Wang ZH, Guo XX. (2015) FoxO6 inhibits cell proliferation in lung carcinoma through up-regulation of USP7. *Mol Med Rep.* 12(1):575-80.
- Huether R, Dong L, Chen X, Wu G, Parker M, Wei L, Ma J, Edmonson MN, Hedlund EK, Rusch MC, Shurtleff SA, Mulder HL, Boggs K, Vadordaria B, Cheng J, Yergeau D, Song G, Becksfort J, Lemmon G, Weber C, Cai Z, Dang J, Walsh M, Gedman AL, Faber Z, Easton J, Gruber T, Kriwacki RW, Partridge JF, Ding L, Wilson RK, Mardis ER, Mullighan CG, Gilbertson RJ, Baker SJ, Zambetti G, Ellison DW, Zhang J, Downing JR. (2014) The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nat Commun.* 5:3630.
- Human Protein Atlas. [en ligne] <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000187555-USP7/pathology> [page consultée le 28/03/2019] et <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000187555-USP7/cell> [page consultée le 28/03/2019]
- Hutchins JR, Hughes M, Clarke PR. (2000) Substrate specificity determinants of the checkpoint protein kinase Chk1. *FEBS Lett.* 466(1):91-5.
- Iacobucci I, Di Rorà AG, Falzacappa MV, Agostinelli C, Derenzini E, Ferrari A, Papayannidis C, Lonetti A, Righi S, Imbrogno E, Pomella S, Venturi C, Guadagnuolo V, Cattina F, Ottaviani E, Abbenante MC, Vitale A, Elia L, Russo D, Zinzani PL, Pileri S, Pelicci PG, Martinelli G. (2015) In vitro and in vivo single-agent efficacy of checkpoint kinase inhibition in acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol.* 8:125.
- Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. (2004) AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med.* 10(3):299-304.
- Igarashi K, Kataoka K, Itoh K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. (1994) Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature.* 367(6463):568-72.
- Jagannathan M, Nguyen T, Gallo D, Luthra N, Brown GW, Saridakis V, Frappier L. (2014) A role for USP7 in DNA replication. *Mol Cell Biol.* 34(1):132-45.
- Jiang K, Pereira E, Maxfield M, Russell B, Goudelock DM, Sanchez Y. (2003) Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on Ser-345. *J Biol Chem.* 278(27):25207-17.
- Jin Q, Martinez CA, Arcipowski KM, Zhu Y, Gutierrez-Diaz BT, Wang KK, Johnson MR, Volk AG, Wang F, Wu J, Grove C, Wang H, Sokirniy I, Thomas PM, Goo YA, Abshiru NA, Hijiya N, Peirs S, Vandamme N, Berx G, Goossens S, Marshall SA, Rendleman EJ, Takahashi YH, Wang L, Rawat R, Bartom ET, Collings CK, Van Vlierberghe P, Strikoudis A, Kelly S, Ueberheide B, Mantis C, Kandela I, Bourquin JP, Bornhauser B, Serafin V, Bresolin S, Paganin M, Accordi B, Basso G, Kelleher NL, Weinstock J, Kumar S, Crispino JD, Shilatifard A, Ntziachristos P. (2019)

USP7 Cooperates with NOTCH1 to Drive the Oncogenic Transcriptional Program in T-Cell Leukemia. *Clin Cancer Res.* 25(1):222-239.

Jutzi JS, Basu T, Pellmann M, Kaiser S, Steinemann D, Sanders MA, Hinai ASA, Zeilemaker A, Bojtine Kovacs S, Koellerer C, Ostendorp J, Aumann K, Wang W, Raffoux E, Cassinat B, Bullinger L, Schlegelberger B, Valk PJM, Pahl HL. (2019)

Altered NFE2 activity predisposes to leukemic transformation and myelosarcoma with AML-specific aberrations. *Blood.* 133(16):1766-1777.

Kaneko YS, Watanabe N, Morisaki H, Akita H, Fujimoto A, Tominaga K, Terasawa M, Tachibana A, Ikeda K, Nakanishi M. (1999) Cell-cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1kinase. *Oncogene.* 18(25):3673-81.

Karp JE, Thomas BM, Greer JM, Sorge C, Gore SD, Pratz KW, Smith BD, Flatten KS, Peterson K, Schneider P, Mackey K, Freshwater T, Levis MJ, McDevitt MA, Carraway HE, Gladstone DE, Showel MM, Loechner S, Parry DA, Horowitz JA, Isaacs R, Kaufmann SH. (2012) Phase I and pharmacologic trial of cytosine arabinoside with the selective checkpoint 1 inhibitor Sch 900776 in refractory acute leukemias. *Clin Cancer Res.* 18(24):6723-31.

Katsuragi Y, Sagata N. (2004) Regulation of Chk1 kinase by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 15(4):1680-9.

Kaufmann KB, Gründer A, Hadlich T, Wehrle J, Gothwal M, Bogeska R, Seeger TS, Kayser S, Pham KB, Jutzi JS, Ganzenmüller L, Steinemann D, Schlegelberger B, Wagner JM, Jung M, Will B, Steidl U, Aumann K, Werner M, Günther T, Schüle R, Rambaldi A, Pahl HL. (2012) A novel murine model of myeloproliferative disorders generated by overexpression of the transcription factor NF-E2. *J Exp Med.* 209(1):35-50.

Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, Roth GJ, Papayannopoulou T, Foster DC. (1994) Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature.* 369(6481):568-71.

Kaushansky K. (2016) Thrombopoietin and its receptor in normal and neoplastic hematopoiesis. *Thromb J.* 14:40.

Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. (1958) Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol.* 20(6):350-5.

Keersmaecker (De) K, Real PJ, Gatta GD, Palomero T, Sulis ML, Tosello V, Van Vlierberghe P, Barnes K, Castillo M, Sole X, Hadler M, Lenz J, Aplan PD, Kelliher M, Kee BL, Pandolfi PP, Kappes D, Gounari F, Petrie H, Van der Meulen J, Speleman F, Paietta E, Racevskis J, Wiernik PH, Rowe JM, Soulier J, Avran D, Cavé H, Dastugue N, Raimondi S, Meijerink JP, Cordon-Cardo C, Califano A, Ferrando AA. (2010) The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation. *Nat Med.* 16(11):1321-7.

Kessler BM, Fortunati E, Melis M, Pals CE, Clevers H, Maurice MM. (2007) Proteome changes induced by knock-down of the deubiquitylating enzyme HAUSP/USP7. *J Proteome Res.* 6(11):4163-72.

Khoronenkova SV, Dianova II, Ternette N, Kessler BM, Parsons JL, Dianov GL. (2012) ATM-dependent downregulation of USP7/HAUSP by PPM1G activates p53 response to DNA damage. *Mol Cell.* 45(6):801-13.

- Kim CJ, Lee JH, Song JW, Cho YG, Kim SY, Nam SW, Yoo NJ, Park WS, Lee JY. (2007) Chk1 frameshift mutation in sporadic and hereditary non-polypoid colorectal cancers with microsatellite instability. *Eur J Surg Oncol.* 33(5):580-5.
- Kim RQ, Sixma TK. (2017) Regulation of USP7: A High Incidence of E3 Complexes. *J Mol Biol.* 2017 Nov 10;429(22):3395-3408.
- Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, Ruvolo V, Tsao T, Zeng Z, Vassilev LT, Andreeff M. (2005) MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood.* 106(9):3150-9.
- Kon N, Kobayashi Y, Li M, Brooks CL, Ludwig T, Gu W. (2010) Inactivation of HAUSP in vivo modulates p53 function. *Oncogene.* 29(9):1270-9.
- Krajewska M, Fehrmann RS, Schoonen PM, Labib S, de Vries EG, Franke L, van Vugt MA. (2015) ATR inhibition preferentially targets homologous recombination-deficient tumor cells. *Oncogene.* 34(26):3474-81.
- Krämer A, Mailand N, Lukas C, Syljuåsen RG, Wilkinson CJ, Nigg EA, Bartek J, Lukas J. (2004) Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol.* 6(9):884-91.
- Kumagai A, Dunphy WG. (2000) Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell.* 6(4):839-49.
- Kumar S, Brown A, Tchounwou PB. (2018) Trisenox disrupts MDM2-DAXX-HAUSP complex and activates p53, cell cycle regulation and apoptosis in acute leukemia cells. *Oncotarget.* 9(69):33138-33148.
- Kuvarina ON, Herglotz J, Kolodziej S, Kohrs N, Herkt S, Wojcik B, Oellerich T, Corso J, Behrens K, Kumar A, Hussong H, Urlaub H, Koch J, Serve H, Bonig H, Stocking C, Rieger MA, Lausen J. (2015) RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood.* 125(23):3570-9.
- Lakin, N.D. and Jackson, S.P. (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18, 7644–7655
- Lam MH, Liu Q, Elledge SJ, Rosen JM. (2004) Chk1 is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell.* 6(1):45-59.
- Lebart MC, Mariani J, Furelaud G. La régulation du cycle cellulaire. [en ligne] <https://planet-vie.ens.fr/content/regulation-cycle-cellulaire> [page consultée le 30/01/19]
- Lecine P, Villeval JL, Vyas P, Swencki B, Xu Y, Shivdasani RA. (1998) Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood.* 92(5):1608-16.
- Lecona E, Rodriguez-Acebes S, Specks J, Lopez-Contreras AJ, Ruppen I, Murga M, Muñoz J, Mendez J, Fernandez-Capetillo O. (2016) USP7 is a SUMO deubiquitinase essential for DNA replication. *Nat Struct Mol Biol.* 23(4):270-7.
- Lee TL, Shyu YC, Hsu TY, Shen CK. (2008) Itch regulates p45/NF-E2 in vivo by Lys63-linked ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun.* 375(3):326-30.

- Lee HJ, Hwang HI, Jang YJ. (2010a) Mitotic DNA damage response: Polo-like kinase-1 is dephosphorylated through ATM-Chk1 pathway. *Cell Cycle*. 9(12):2389-98.
- Lee TL, Shyu YC, Hsu PH, Chang CW, Wen SC, Hsiao WY, Tsai MD, Shen CK. (2010b) JNK-mediated turnover and stabilization of the transcription factor p45/NF-E2 during differentiation of murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(1):52-7.
- Lee G, Oh TI, Um KB, Yoon H, Son J, Kim BM, Kim HI, Kim H, Kim YJ, Lee CS, Lim JH. (2016) Small-molecule inhibitors of USP7 induce apoptosis through oxidative and endoplasmic reticulum stress in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 470(1):181-186.
- Leung-Pineda V, Ryan CE, Piwnica-Worms H. (2006) Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a Chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit. *Mol Cell Biol*. 26(20):7529-38.
- Leung-Pineda V, Huh J, Piwnica-Worms H. (2009) DDB1 targets Chk1 to the Cul4 E3 ligase complex in normal cycling cells and in cells experiencing replication stress. *Cancer Res*. 69(6):2630-7.
- Levin J, Peng JP, Baker GR, Villeval JL, Lecine P, Burstein SA, Shivdasani RA. (1999) Pathophysiology of thrombocytopenia and anemia in mice lacking transcription factor NF-E2. *Blood*. 94(9):3037-47.
- Lezina L, Purmessur N, Antonov AV, Ivanova T, Karpova E, Kirshan K, Ivan M, Aksenova V, Tentler D, Garabadiu AV, Melino G, Barlev NA. (2013), miR-16 and miR-26a target checkpoint kinase Wee1 and CHK1 in response to p53 activation by genotoxic stress, *Cell death and diseases* 4
- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J. (2002) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416, 648–653
- Li, M., Brooks, C.L., Kon, N. and Gu, W. (2004) A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol. Cell* 13, 879–886.
- Li P, Goto H, Kasahara K, Matsuyama M, Wang Z, Yatabe Y, Kiyono T, Inagaki M. (2012) P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. *Mol Biol Cell*. 23(8):1582-92.
- Liang L, Peng Y, Zhang J, Zhang Y, Roy M, Han X, Xiao X, Sun S, Liu H, Nie L, Kuang Y, Zhu Z, Deng J, Xia Y, Sankaran VG, Hillyer CD, Mohandas N, Ye M, An X, Liu J. (2019) Deubiquitylase USP7 regulates human terminal erythroid differentiation by stabilizing GATA1. *Haematologica*. pii: haematol.2018.206227.
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ. (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*. 14(12):1448-59.
- Liu S, Bekker-Jensen S, Mailand N, Lukas C, Bartek J, Lukas J. (2006a) Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol*. 26(16):6056-64.
- Liu P, Barkley LR, Day T, Bi X, Slater DM, Alexandrow MG, Nasheuer HP, Vaziri C. (2006b) The Chk1-mediated S-phase checkpoint targets initiation factor Cdc45 via a Cdc25A/Cdk2-independent mechanism. *J Biol Chem*. 281(41):30631-44.
- Liu X, Yang X, Li Y, Zhao S, Li C, Ma P, Mao B. (2016) Trip12 is an E3 ubiquitin ligase for USP7/HAUSP involved in the DNA damage response. *FEBS Lett*. 590(23):4213-4222.

- Long J, Parkin B, Ouillette P, Bixby D, Shedden K, Erba H, Wang S, Malek SN. (2010) Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2inhibitors in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*. 116(1):71-80.
- López-Contreras AJ, Gutierrez-Martinez P, Specks J, Rodrigo-Perez S, Fernandez-Capetillo O. (2012) An extra allele of Chk1 limits oncogene-induced replicative stress and promotes transformation. *J Exp Med*. 209(3):455-61.
- Lopez-Girona A, Tanaka K, Chen XB, Baber BA, McGowan CH, Russell P. (2001) Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(20):11289-94.
- Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, Vainchenker W, Chang Y. (2008) Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*. 112(8):3164-74.
- Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. (1999) Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 341(14):1051-62.
- Lunardi A, Varmeh S, Chen M, Taulli R, Guarnerio J, Ala U, Seitzer N, Ishikawa T, Carver B, Hoobs R, Quarantotti V, Ng C, Berger A, Nardella C, Poliseno L, Montironi R, Castillon-Martin M, Cordon-Cardo C, Signoretti S, Pandolfi P. (2015), Suppression of CHK1 by ETS family members promotes DNA damage response bypass and tumorigenesis, *Cancer discovery* 5 : 550-563.
- Lundgren K, Holm K, Nordenskjöld B, Borg A, Landberg G. (2008) Gene products of chromosome 11q and their association with CCND1 gene amplification and tamoxifen resistance in premenopausal breast cancer. *Breast Cancer Res*. 10(5):R81.
- Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. (2009) Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*. 136(5):823-37.
- Ma H, Chen H, Guo X, Wang Z, Sowa ME, Zheng L, Hu S, Zeng P, Guo R, Diao J, Lan F, Harper JW, Shi YG, Xu Y, Shi Y. (2012) M phase phosphorylation of the epigenetic regulator UHRF1 regulates its physical association with the deubiquitylase USP7and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(13):4828-33.
- Ma P, Yang X, Kong Q, Li C, Yang S, Li Y, Mao B. (2014) The ubiquitin ligase RNF220 enhances canonical Wnt signaling through USP7-mediated deubiquitination of β -catenin. *Mol Cell Biol*. 34(23):4355-66.
- Machlus KR, Italiano JE Jr. (2013) The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*. 201(6):785-96.
- Macûrek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompmaker R, Freire R, Clouin C, Taylor SS, Yaffe MB, Medema RH. (2008) Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*. 455(7209):119-23.
- Madoz-Gúrpide J, Cañamero M, Sanchez L, Solano J, Alfonso P, Casal JI. (2007) A proteomics analysis of cell signaling alterations in colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics*. 6(12):2150-64.
- Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuâsen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J. (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*. 288(5470):1425-9.

- Mailand N, Bekker-Jensen S, Bartek J, Lukas J. (2006) Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol Cell*. 23(3):307-18.
- Malumbres M. (2014) Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol*. 15(6):122.
- Masuya D, Huang C, Liu D, Nakashima T, Yokomise H, Ueno M, Nakashima N, Sumitomo S. (2006) The HAUSP gene plays an important role in non-small cell lung carcinogenesis through p53-dependent pathways. *J Pathol*. 208(5):724-32.
- Matsuura K, Wakasugi M, Yamashita K, Matsunaga T. (2008) Cleavage-mediated activation of Chk1 during apoptosis. *J Biol Chem*. 283(37):25485-91.
- Mc Keon JE., Sha D., Li L., Chin LS. (2015). Parkin-mediated K63-polyubiquitination targets ubiquitin C-terminal hydrolase L1 for degradation by the autophagy-lysosome system. *Cell Mol Life Sci*. 72, 1811-1824.
- Melendez J, Stengel K, Zhou X, Chauhan BK, Debidia M, Andreassen P, Lang RA, Zheng Y. (2011) RhoA GTPase is dispensable for actomyosin regulation but is essential for mitosis in primary mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*. 286(17):15132-7.
- Menoyo A, Alazzouzi H, Espín E, Armengol M, Yamamoto H, Schwartz S Jr. (2001) Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res*. 61(21):7727-30.
- Metcalf D, Carpinelli MR, Hyland C, Mifsud S, Dirago L, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. (2005) Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the c-Myb gene. *Blood*. 105(9):3480-7.
- Miyawaki K, Iwasaki H, Jiromaru T, Kusumoto H, Yurino A, Sugio T, Uehara Y, Odawara J, Daitoku S, Kunisaki Y, Mori Y, Arinobu Y, Tsuzuki H, Kikushige Y, Iino T, Kato K, Takenaka K, Miyamoto T, Maeda T, Akashi K. (2017) Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. *Blood*. 129(25):3332-3343.
- Moiseeva TN, Yin Y, Calderon MJ, Qian C, Schamus-Haynes S, Sugitani N, Osmanbeyoglu HU, Rothenberg E, Watkins SC, Bakkenist CJ. (2019) An ATR and CHK1 kinase signaling mechanism that limits origin firing during unperturbed DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pii: 201903418.
- Moison C, Lavallée VP, Thiollier C, Lehnertz B, Boivin I, Mayotte N, Gareau Y, Fréchette M, Blouin-Chagnon V, Corneau S, Lavallée S, Lemieux S, Marinier A, Hébert J, Sauvageau G. (2019) Complex karyotype AML displays G2/M signature and hypersensitivity to PLK1 inhibition. *Blood Adv*. 3(4):552-563.
- Montano R, Chung I, Garner KM, Parry D, Eastman A. (2012) Preclinical development of the novel Chk1 inhibitor SCH900776 in combination with DNA-damaging agents and antimetabolites. *Mol Cancer Ther*. 11(2):427-38.
- Morotti A, Panuzzo C, Crivellaro S, Pergolizzi B, Familiari U, Berger AH, Saglio G, Pandolfi PP. (2014) BCR-ABL disrupts PTEN nuclear-cytoplasmic shuttling through phosphorylation-dependent activation of HAUSP. *Leukemia*. 28(6):1326-33.
- Moser BA, Brondello JM, Baber-Furnari B, Russell P. (2000) Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast. *Mol Cell Biol*. 20(12):4288-94.

- Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M. (2002) Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene*. 294(1-2):1-12.
- Motohashi H, Fujita R, Takayama M, Inoue A, Katsuoka F, Bresnick EH, Yamamoto M. (2011) Molecular determinants for small Maf protein control of platelet production. *Mol Cell Biol*. 31(1):151-62.
- Moussa O, LaRue AC, Abangan RS Jr, Williams CR, Zhang XK, Masuya M, Gong YZ, Spyropoulos DD, Ogawa M, Gilkeson G, Watson DK. (2010) Thrombocytopenia in mice lacking the carboxy-terminal regulatory domain of the Ets transcription factor Fli1. *Mol Cell Biol*. 30(21):5194-206.
- Myers K, Gagou ME, Zuazua-Villar P, Rodriguez R, Meuth M. (2009) ATR and Chk1 suppress a caspase-3-dependent apoptotic response following DNA replication stress. *PLoS Genet*. 5(1):e1000324.
- Nakamura-Ishizu A, Matsumura T, Stumpf PS, Umemoto T, Takizawa H, Takihara Y, O'Neil A, Majeed ABBA, MacArthur BD, Suda T. (2018) Thrombopoietin Metabolically Primes Hematopoietic Stem Cells to Megakaryocyte-Lineage Differentiation. *Cell Rep*. 25(7):1772-1785.
- Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, Graf T. (2000) GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood*. 95(8):2543-51.
- Niida H, Katsuno Y, Banerjee B, Hande MP, Nakanishi M. (2007) Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol Cell Biol*. 27(7):2572-81.
- Nijman SM., Luna-Vargas MP., Velds A., Brummelkamp TR., Dirac AM., Sixma TK., Bernards R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*. 123, 773-786.
- Noetzli LJ, French SL, Machlus KR. (2019) New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. ATVBAHA119312129.
- Noguera NI, Song MS, Divona M, Catalano G, Calvo KL, García F, Ottone T, Florenzano F, Faraoni I, Battistini L, Colombo E, Amadori S, Pandolfi PP, Lo-Coco F. (2013) Nucleophosmin/B26 regulates PTEN through interaction with HAUSP in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 27(5):1037-43.
- Novellasmunt L, Foglizzo V, Cuadrado L, Antas P, Kucharska A, Encheva V, Snijders AP, Li VSW. (2017) USP7 Is a Tumor-Specific WNT Activator for APC-Mutated Colorectal Cancer by Mediating β -Catenin Deubiquitination. *Cell Rep*. 21(3):612-627.
- O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P. (1997) Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J*. 16(3):545-54.
- Okita N, Minato S, Ohmi E, Tanuma S, Higami Y. (2012) DNA damage-induced CHK1 autophosphorylation at Ser296 is regulated by an intramolecular mechanism. *FEBS Lett*. 586(22):3974-9.
- Onodera K, Shavit JA, Motohashi H, Yamamoto M, Engel JD. (2000) Perinatal synthetic lethality and hematopoietic defects in compound mafG::mafK mutant mice. *EMBO J*. 19(6):1335-45.
- Ou YH, Chung PH, Sun TP, Shieh SY. (2005) p53 C-terminal phosphorylation by CHK1 and CHK2 participates in the regulation of DNA-damage-induced C-terminal acetylation. *Mol Biol Cell*. 16(4):1684-95.

- Özen A, Rougé L, Bashore C, Hearn BR, Skelton NJ, Dueber EC. (2018) Selectively Modulating Conformational States of USP7 Catalytic Domain for Activation. *Structure*. 26(1):72-84.
- Pabla N, Bhatt K, Dong Z. (2012) Checkpoint kinase 1 (Chk1)-short is a splice variant and endogenous inhibitor of Chk1 that regulates cell cycle and DNA damage checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(1):197-202.
- Park C, Suh Y, Cuervo AM. (2015) Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat Commun*. 6:6823.
- Passegué E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 Suppl 1:11842-9.
- Patil M, Pabla N, Dong Z. (2013) Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci*. 70(21):4009-21.
- Peddibhotla S, Lam MH, Gonzalez-Rimbau M, Rosen JM. (2009) The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(13):5159-64.
- Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, Perry J, Malcovati L, Della Porta MG, Jädersten M, Killick S, Verma A, Norbury CJ, Hellström-Lindberg E, Wainscoat JS, Boultonwood J. (2010) Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 24(4):756-64.
- Peng J., Schwartz D., Elias JE., Thoreen CC., Cheng D., Marsischky G., Roelofs J., Finley D., Gygi SP. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*. 21 : 921-926.
- Perdomo J, Fock EL, Kaur G, Yan F, Khachigian LM, Jans DA, Chong BH. (2010) A monopartite sequence is essential for p45 NF-E2 nuclear translocation, transcriptional activity and platelet production. *J Thromb Haemost*. 8(11):2542-53.
- Peschiarioli A, Dorrello NV, Guardavaccaro D, Venere M, Halazonetis T, Sherman NE, Pagano M. (2006) SCFbetaTrCP-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. *Mol Cell*. 23(3):319-29.
- Petsalaki E, Akoumianaki T, Black EJ, Gillespie DA, Zachos G. (2011) Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *J Cell Biol*. 195(3):449-66.
- PhosphoSitePlus [en ligne]
<https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=2971&showAllSites=true> [page consultée le 05/04/2019]
- Pickart CM. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 7, 503-533.
- Pinto-Fernandez A., Kessler BM. (2016) DUBbing cancer: deubiquitylating enzymes involved in epigenetics, DNA damage and the cell cycle as therapeutic targets. *Front Genet*. 133.
- Pozhidaeva A, Valles G, Wang F, Wu J, Sterner DE, Nguyen P, Weinstock J, Kumar KGS, Kanyo J, Wright D, Bezsonova I. (2017) USP7-Specific Inhibitors Target and Modify the Enzyme's Active Site via Distinct Chemical Mechanisms. *Cell Chem Biol*. 24(12):1501-1512.

Pozhidaeva A, Bezsonova I. (2019) USP7: Structure, substrate specificity, and inhibition. *DNA Repair (Amst)*. 76:30-39.

Puc J, Keniry M, Li HS, Pandita TK, Choudhury AD, Memeo L, Mansukhani M, Murty VV, Gaciong Z, Meek SE, Piwnica-Worms H, Hibshoosh H, Parsons R. (2005) Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell*. 7(2):193-204.

Qian J, Pentz K, Zhu Q, Wang Q, He J, Srivastava AK, Wani AA. (2015) USP7 modulates UV-induced PCNA monoubiquitination by regulating DNA polymerase η stability. *Oncogene*. 34(36):4791-6.

Qian M, Zhao X, Devidas M, Yang W, Gocho Y, Smith C, Gastier-Foster JM, Li Y, Xu H, Zhang S, Jeha S, Zhai X, Sanda T, Winter SS, Dunsmore KP, Raetz EA, Carroll WL, Winick NJ, Rabin KR, Zweidler-Mckay PA, Wood B, Pui CH, Evans WE, Hunger SP, Mullighan CG, Relling MV, Loh ML, Yang JJ. (2019) Genome-wide association study of susceptibility loci for T-cell acute lymphoblastic leukemia in children. *J Natl Cancer Inst*. pii: djz043.

Qin W, Leonhardt H, Spada F. (2011) Usp7 and Uhrf1 control ubiquitination and stability of the maintenance DNA methyltransferase Dnmt1. *J Cell Biochem*. 112(2):439-44.

Radomska HS, Alberich-Jordà M, Will B, Gonzalez D, Delwel R, Tenen DG. (2012) Targeting CDK1 promotes FLT3-activated acute myeloid leukemia differentiation through C/EBP α . *J Clin Invest*. 122(8):2955-66.

Rahmani M, Grant S. (2002) UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) blocks PMA-induced maturation and reciprocally promotes apoptosis in human myelomonocytic leukemia cells (U937). *Cell Cycle*. 1(4):273-81.

Ravandi F, Gojo I, Patnaik MM, Minden MD, Kantarjian H, Johnson-Levonas AO, Fancourt C, Lam R, Jones MB, Knox CD, Rose S, Patel PS, Tibes R. (2016) A phase I trial of the human double minute 2 inhibitor (MK-8242) in patients with refractory/recurrent acute myelogenous leukemia (AML). *Leuk Res*. 48:92-100.

Rawat R, Starczynowski DT, Ntziachristos P. (2019) Nuclear deubiquitination in the spotlight: the multifaceted nature of USP7 biology in disease. *Curr Opin Cell Biol*. 58:85-94.

Ray-Coquard I, Blay JY, Italiano A, Le Cesne A, Penel N, Zhi J, Heil F, Rueger R, Graves B, Ding M, Geho D, Middleton SA, Vassilev LT, Nichols GL, Bui BN. (2012) Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol*. 13(11):1133-40.

Reddy BA, van der Knaap JA, Bot AG, Mohd-Sarip A, Dekkers DH, Timmermans MA, Martens JW, Demmers JA, Verrijzer CP. (2014) Nucleotide biosynthetic enzyme GMP synthase is a TRIM21-controlled relay of p53 stabilization. *Mol Cell*. 53(3):458-70.

Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, Dynlacht BD. (2002) E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev*. 16(2):245-56.

Renner AG, Dos Santos C, Recher C, Bailly C, Créancier L, Kruczynski A, Payrastre B, Manenti S. (2009) Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells. *Blood*. 114(3):659-62.

- Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. (2008) Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. 22(5):915-31.
- Reverdy C, Conrath S, Lopez R, Planquette C, Atmanene C, Collura V, Harpon J, Battaglia V, Vivat V, Sippl W, Colland F.(2012) Discovery of specific inhibitors of human USP7/HAUSP deubiquitinating enzyme. *Chem Biol*. 19(4):467-77.
- Richter-Pechańska P, Kunz JB, Hof J, Zimmermann M, Rausch T, Bandapalli OR, Orlova E, Scapinello G, Sagi JC, Stanulla M, Schrappe M, Cario G, Kirschner-Schwabe R, Eckert C, Benes V, Korbel JO, Muckenthaler MU, Kulozik AE. (2017) Identification of a genetically defined ultra-high-risk group in relapsed pediatric T-lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*. 7(2):e523.
- Ritorto MS, Ewan R, Perez-Oliva AB, Knebel A, Buhrlage SJ, Wightman M, Kelly SM, Wood NT, Virdee S, Gray NS, Morrice NA, Alessi DR, Trost M. (2014) Screening of DUB activity and specificity by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Commun*. 5:4763.
- Robinson PA, Lomonte P, Leek, Markham AF, Everett RD. (1998) Assignment1 of herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease gene HAUSP to human chromosome band 16p13.3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 83(1-2):100.
- Rodier G, Kirsh O, Baraibar M, Houlès T, Lacroix M, Delpech H, Hatchi E, Arnould S, Severac D, Dubois E, Caramel J, Julin E, Friguet B, Le Cam L, Sardet C. (2015), The transcription factor E4F1 coordinates CHK1-dependent checkpoint and mitochondrial functions, *Cell report* 11 : 1-14.
- Rodriguez-Fraticelli AE, Wolock SL, Weinreb CS, Panero R, Patel SH, Jankovic M, Sun J, Calogero RA, Klein AM, Camargo FD. (2018) Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature*. 2018 Jan 11;553(7687):212-216.
- Ronco C, Martin AR, Demange L, Benhida R. (2016) ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells. *Medchemcomm*. 8(2):295-319.
- Rothbart SB, Dickson BM, Ong MS, Krajewski K, Houliston S, Kireev DB, Arrowsmith CH, Strahl BD. (2013) Multivalent histone engagement by the linked tandem Tudor and PHD domains of UHRF1 is required for the epigenetic inheritance of DNA methylation. *Genes Dev*. 27(11):1288-98.
- Rougé L., Bainbridge TW., Kwok M., Tong R., Di Lello P., Wertz IE., Maurer T., Ernst JA., Murray J. (2016). Molecular understanding of USP7 substrate recognition and C-terminal activation. *Structure*. 24, 1335-1345.
- Rundle S, Bradbury A, Drew Y, Curtin NJ. (2017) Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 9(5).
- Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, Elledge SJ. (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*. 277(5331):1497-501.
- Saridakis V, Sheng Y, Sarkari F, Holowaty MN, Shire K, Nguyen T, Zhang RG, Liao J, Lee W, Edwards AM, Arrowsmith CH, Frappier L. (2005) Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization. *Mol Cell*. 18(1):25-36.

- Sarkari F, Sanchez-Alcaraz T, Wang S, Holowaty MN, Sheng Y, Frappier L. (2009) EBNA1-mediated recruitment of a histone H2B deubiquitylating complex to the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *PLoS Pathog.* 5(10):e1000624.
- Sarmiento LM, Póvoa V, Nascimento R, Real G, Antunes I, Martins LR, Moita C, Alves PM, Abecasis M, Moita LF, Parkhouse RM, Meijerink JP, Barata JT. (2015) CHK1 overexpression in T-cell acute lymphoblastic leukemia is essential for proliferation and survival by preventing excessive replication stress. *Oncogene.* 34(23):2978-90.
- Schenk EL, Koh BD, Flatten KS, Peterson KL, Parry D, Hess AD, Smith BD, Karp JE, Karnitz LM, Kaufmann SH. (2012) Effects of selective checkpoint kinase 1 inhibition on cytarabine cytotoxicity in acute myelogenous leukemia cells in vitro. *Clin Cancer Res.* 18(19):5364-73.
- Schmitt E, Boutros R, Froment C, Monsarrat B, Ducommun B, Dozier C. (2006) CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage. *J Cell Sci.* 119(Pt 20):4269-75.
- Schuler F, Weiss JG, Lindner SE, Lohmüller M, Herzog S, Spiegl SF, Menke P, Geley S, Labi V, Villunger A. (2017) Checkpoint kinase 1 is essential for normal B cell development and lymphomagenesis. *Nat Commun.* 8(1):1697.
- Schuler F, Afreen S, Manzl C, Häcker G, Erlacher M, Villunger A. (2019) Checkpoint kinase 1 is essential for fetal and adult hematopoiesis. *EMBO Rep.* pii: e47026.
- Schulze J, Lopez-Contreras AJ, Uluçkan Ö, Graña-Castro O, Fernandez-Capetillo O, Wagner EF. (2014) Fos-dependent induction of Chk1 protects osteoblasts from replication stress. *Cell Cycle.* 13(12):1980-6.
- Scorah J, Dong MQ, Yates JR 3rd, Scott M, Gillespie D, McGowan CH. (2008) A conserved proliferating cell nuclear antigen-interacting protein sequence in Chk1 is required for checkpoint function. *J Biol Chem.* 283(25):17250-9.
- Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G. (2008) Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science.* 320(5883):1655-8.
- Sengupta, S. and Harris, C.C. (2005) p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 44–55.
- Séverin S, Ghevaert C, Mazharian A. (2010) The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation. *J Thromb Haemost.* 8(1):17-26.
- Sexauer A, Perl A, Yang X, Borowitz M, Gocke C, Rajkhowa T, Thiede C, Frattini M, Nybakken GE, Pratz K, Karp J, Smith BD, Levis M. (2012) Terminal myeloid differentiation in vivo is induced by FLT3 inhibition in FLT3/ITD AML. *Blood.* 120(20):4205-14.
- Shan H, Li X, Xiao X, Dai Y, Huang J, Song J, Liu M, Yang L, Lei H, Tong Y, Zhou L, Xu H, Wu Y. (2018) USP7 deubiquitinates and stabilizes NOTCH1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Signal Transduct Target Ther.* 3:29.
- Shao L, Wang Y, Chang J, Luo Y, Meng A, Zhou D. (2013) Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury. *Transl Cancer Res.* 2(5):397-411.

- Shao G, Wang M, Fan X, Zhong L, Wang Z, Zhang P, Ji S. (2019) lncRNA CASC9 positively regulates CHK1 to promote breast cancer cell proliferation and survival through sponging the miR-195/497 cluster. *Int J Oncol.* 54(5):1665-1675.
- Sheng Y, Saridakis V, Sarkari F, Duan S, Wu T, Arrowsmith CH, Frappier L. (2006) Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP. *Nat Struct Mol Biol.* 13(3):285-91.
- Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 14(3):289-300.
- Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H, Nakanishi M. (2008) Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell.* 132(2):221-32.
- Shiromizu T, Goto H, Tomono Y, Bartek J, Totsukawa G, Inoko A, Nakanishi M, Matsumura F, Inagaki M. (2006) Regulation of mitotic function of Chk1 through phosphorylation at novel sites by cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1). *Genes Cells.* 11(5):477-85.
- Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris CJ, Orkin SH. (1995) Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell.* 81(5):695-704.
- Shyu YC, Lee TL, Ting CY, Wen SC, Hsieh LJ, Li YC, Hwang JL, Lin CC, Shen CK. (2005) Sumoylation of p45/NF-E2: nuclear positioning and transcriptional activation of the mammalian beta-like globin gene locus. *Mol Cell Biol.* 25(23):10365-78.
- Sidi S, Sanda T, Kennedy RD, Hagen AT, Jette CA, Hoffmans R, Pascual J, Imamura S, Kishi S, Amatrudda JF, Kanki JP, Green DR, D'Andrea AA, Look AT. (2008) Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3. *Cell.* 133(5):864-77.
- Singh M., Burrows AC., Torres AE., Pal D., Stromberg B., Insinna C., Dickson A., Westlake CJ., Summers MK. (2019) The Deubiquitinating Enzyme USP37 Stabilizes CHK1 to Promote the Cellular Response to Replication Stress. *BioRxiv.* <https://doi.org/10.1101/652891>
- Smits VA, Reaper PM, Jackson SP. (2006) Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr Biol.* 16(2):150-9.
- Smits VA, Gillespie DA. (2015) DNA damage control: regulation and functions of checkpoint kinase 1. *FEBS J.* 282(19):3681-92.
- Smits VA, Freire R. (2016) USP7/HAUSP: A SUMO deubiquitinase at the heart of DNA replication. *Bioessays.* 38(9):863-8.
- Song MS, Salmena L, Carracedo A, Egia A, Lo-Coco F, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP. (2008) The deubiquitinylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature.* 455(7214):813-7.
- Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(5):283-96.
- Sørensen CS, Syljuåsen RG, Falck J, Schroeder T, Rönnstrand L, Khanna KK, Zhou BB, Bartek J, Lukas J. (2003) Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell.* 3(3):247-58.

Sørensen CS, Hansen LT, Dziegielewska J, Syljuåsen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T. (2005) The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol.* 7(2):195-201.

Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, Harper JW. (2009) Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell.* 138(2):389-403.

Syljuåsen RG, Sørensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, Helleday T, Sehested M, Lukas J, Bartek J. (2005) Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol.* 25(9):3553-62.

Takahashi W, Sasaki K, Kvomatsu N, Mitani K. (2005) TEL/ETV6 accelerates erythroid differentiation and inhibits megakaryocytic maturation in a human leukemia cell line UT-7/GM. *Cancer Sci.* 96(6):340-8.

Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, Tsukiyama T, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishi M, Nakayama K. (2000) Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev.* 14(12):1439-47.

Takam Kanga P, Bassi G, Cassaro A, Midolo M, Di Trapani M, Gatti A, Carusone R, Resci F, Perbellini O, Gottardi M, Bonifacio M, Nwabo Kamdje AH, Ambrosetti A, Krampera M. (2016) Notch signalling drives bone marrow stromal cell-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 7(16):21713-27.

Tamburini J, Green AS, Bardet V, Chapuis N, Park S, Willems L, Uzunov M, Ifrah N, Dreyfus F, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. (2009) Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood.* 114(8):1618-27.

Tang J, Erikson RL, Liu X. (2006) Checkpoint kinase 1 (Chk1) is required for mitotic progression through negative regulation of polo-like kinase 1 (Plk1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(32):11964-9.

Tavana O, Li D, Dai C, Lopez G, Banerjee D, Kon N, Chen C, Califano A, Yamashiro DJ, Sun H, Gu W. (2016) HAUSP deubiquitinates and stabilizes N-Myc in neuroblastoma. *Nat Med.* 22(10):1180-1186.

Tavana O, Gu W. (2017) Modulation of the p53/MDM2 interplay by HAUSP inhibitors. *J Mol Cell Biol.* 9(1):45-52.

Tho LM, Libertini S, Rampling R, Sansom O, Gillespie DA. (2012) Chk1 is essential for chemical carcinogen-induced mouse skin tumorigenesis. *Oncogene.* 31(11):1366-75.

Tober J, Koniski A, McGrath KE, Vemishetti R, Emerson R, de Mesy-Bentley KK, Waugh R, Palis J. (2007) The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood.* 109(4):1433-41.

Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H, Zhao X, Vu BT, Qing W, Packman K, Myklebost O, Heimbrook DC, Vassilev LT. (2006) Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(6):1888-93.

Trakala M, Partida D, Salazar-Roa M, Maroto M, Wachowicz P, de Cárcer G, Malumbres M. (2015) Activation of the endomitotic spindle assembly checkpoint and thrombocytopenia in Plk1-deficient mice. *Blood.* 126(14):1707-14.

- Vainchenker W, Raslova H. (2019) Megakaryocyte polyploidization: role in platelet production. *Platelets*. 1-10.
- Van den Oudenrijn S, Bruin M, Folman CC, Peters M, Faulkner LB, de Haas M, von dem Borne AE. (2000) Mutations in the thrombopoietin receptor, Mpl, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 110(2):441-8.
- Van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, van Triest MH, van den Broek N, Colland F, Maurice MM, Burgering BM. (2006) FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol*. 8(10):1064-73.
- Van der Knaap JA, Kumar BR, Moshkin YM. (2005) GMP synthetase stimulates histone H2B deubiquitylation by the epigenetic silencer USP7. *Mol Cell*. 17(5) :695-707.
- Van der Knaap JA, Kozhevnikova E, Langenberg K, Moshkin YM, Verrijzer CP. (2010) Biosynthetic enzyme GMP synthetase cooperates with ubiquitin-specific protease 7 in transcriptional regulation of ecdysteroid target genes. *Mol Cell Biol*. 30(3):736-44.
- Verlinden L, Vanden Bempt I, Eelen G, Drijkoningen M, Verlinden I, Marchal K, De Wolf-Peeters C, Christiaens MR, Michiels L, Bouillon R, Verstuyf A. (2007) The E2F-regulated gene Chk1 is highly expressed in triple-negative estrogen receptor /progesterone receptor /HER-2 breast carcinomas. *Cancer Res*. 67(14):6574-81.
- Vonderach M, Byrne DP, Barran PE, Eysers PA, Eysers CE. (2019) DNA Binding and Phosphorylation Regulate the Core Structure of the NF- κ B p50 Transcription Factor. *J Am Soc Mass Spectrom*. 30(1):128-138.
- Walter SA, Cutler RE Jr, Martinez R, Gishizky M, Hill RJ. (2003) Stk10, a new member of the polo-like kinase kinase family highly expressed in hematopoietic tissue. *J Biol Chem*. 278(20):18221-8.
- Walworth N, Davey S, Beach D. (1993) Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature*. 363(6427):368-71.
- Walworth NC, Bernards R. (1996) rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science*. 271(5247):353-6.
- Wang X, Kennedy RD, Ray K, Stuckert P, Ellenberger T, D'Andrea AD. (2007) Chk1-mediated phosphorylation of FANCE is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol*. 27(8):3098-108.
- Wang J, Han X, Feng X, Wang Z, Zhang Y. (2012a) Coupling cellular localization and function of checkpoint kinase 1 (Chk1) in checkpoints and cell viability. *J Biol Chem*. 287(30):25501-9.
- Wang X, Ma Z, Xiao Z, Liu H, Dou Z, Feng X, Shi H. (2012b) Chk1 knockdown confers radiosensitization in prostate cancer stem cells. *Oncol Rep*. 28(6):2247-54.
- Wang Q, Ma S, Song N, Li X, Liu L, Yang S, Ding X, Shan L, Zhou X, Su D, Wang Y, Zhang Q, Liu X, Yu N, Zhang K, Shang Y, Yao Z, Shi L. (2016) Stabilization of histone demethylase PHF8 by USP7 promotes breast carcinogenesis. *J Clin Invest*. 2016 Jun 1;126(6):2205-20.
- Webster JA, Tibes R, Morris L, Blackford AL, Litzow M, Patnaik M, Rosner GL, Gojo I, Kinders R, Wang L, Doyle LA, Huntoon CJ, Karnitz LM, Kaufmann SH, Karp JE, Smith BD. (2017) Randomized phase II trial of cytosine arabinoside with and without the CHK1 inhibitor MK-8776 in relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 61:108-116.

- Weinstock J, Wu J, Cao P, Kingsbury WD, McDermott JL, Kodrasov MP, McKelvey DM, Suresh Kumar KG, Goldenberg SJ, Mattern MR, Nicholson B. (2012) Selective Dual Inhibitors of the Cancer-Related Deubiquitylating Proteases USP7 and USP47. *ACS Med Chem Lett.* 3(10):789-92.
- Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, Methia N, Breton-Gorius J, Cosman D, Vainchenker W. (1994) cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature.* 369(6481):571-4.
- Wilkinson KD. (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* 11, 1245-1256.
- Wilsker D, Petermann E, Helleday T, Bunz F. (2008) Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(52):20752-7.
- Wrigley JD., Eckersley K., Hardern IM., Millard L., Walters M., Peters SW., Mott R., Nowak T., Ward RA., Simpson PB., Hudson K. (2011). Enzymatic Characterisation of USP7 Deubiquitinating activity and Inhibition. *Cell Biochemistry and Biophysics.* 1-2, 99-111.
- Wu HT, Kuo YC, Hung JJ, Huang CH, Chen WY, Chou TY, Chen Y, Chen YJ, Chen YJ, Cheng WC, Teng SC, Wu KJ. (2016) K63-polyubiquitinated HAUSP deubiquitinates HIF-1 α and dictates H3K56 acetylation promoting hypoxia-induced tumour progression. *Nat Commun.* 7:13644.
- Xu H, Cheung IY, Wei XX, Tran H, Gao X, Cheung NK. (2011) Checkpoint kinase inhibitor synergizes with DNA-damaging agents in G1 checkpoint-defective neuroblastoma. *Int J Cancer.* 129(8):1953-62.
- Xu X, Zhao Y, Xu M, Dai Q, Meng W, Yang J, Qin R. (2011b) Activation of Notch signal pathway is associated with a poorer prognosis in acute myeloid leukemia. *Med Oncol.* 28 Suppl 1:S483-9.
- Xu J, Li Y, Wang F, Wang X, Cheng B, Ye F, Xie X, Zhou C, Lu W. (2013) Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene.* 32(8):976-87.
- Yang XH, Shiotani B, Classon M, Zou L. (2008) Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination. *Genes Dev.* 22(9):1147-52.
- Yang Z, Huo S, Shan Y, Liu H, Xu Y, Yao K, Li X, Zhang X. (2012) STAT3 repressed USP7 expression is crucial for colon cancer development. *FEBS Lett.* 21;586(19):3013-7.
- Yang X, Xu W, Hu Z, Zhang Y, Xu N. (2014) Chk1 is required for the metaphase-anaphase transition via regulating the expression and localization of Cdc20 and Mad2. *Life Sci.* 106(1-2):12-8.
- Yao Q, Weigel B, Kersey J. (2007) Synergism between etoposide and 17-AAG in leukemia cells: critical roles for Hsp90, FLT3, topoisomerase II, Chk1, and Rad51. *Clin Cancer Res.* 13(5):1591-600.
- Yim H, Shin SB, Woo SU, Lee PC, Erikson RL. (2017) Plk1-mediated stabilization of 53BP1 through USP7 regulates centrosome positioning to maintain bipolarity. *Oncogene.* 36(7):966-978.
- Yuan LL, Green AS, Bertoli S, Grimal F, Mansat-De Mas V, Dozier C, Tamburini J, Récher C, Didier C, Manenti S. (2014a) Pim kinases phosphorylate Chk1 and regulate its functions in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 28(2):293-301.

- Yuan LL, Green A, David L, Dozier C, Récher C, Didier C, Tamburini J, Manenti S. (2014b) Targeting CHK1 inhibits cell proliferation in FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 38(11):1342-9.
- Yuan R, Vos HR, van Es RM, Chen J, Burgering BM, Westendorp B, de Bruin A. (2018) Chk1 and 14-3-3 proteins inhibit atypical E2Fs to prevent a permanent cell cycle arrest. *EMBO J.* 37(5). pii: e97877.
- Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, Earnshaw WC, Gillespie DA. (2007) Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell.* 12(2):247-60.
- Zaman MM, Nomura T, Takagi T, Okamura T, Jin W, Shinagawa T, Tanaka Y, Ishii S. (2013) Ubiquitination-deubiquitination by the TRIM27-USP7 complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 33(24):4971-84.
- Zaugg K, Su YW, Reilly PT, Moolani Y, Cheung CC, Hakem R, Hirao A, Liu Q, Elledge SJ, Mak TW. (2007) Cross-talk between Chk1 and Chk2 in double-mutant thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(10):3805-10.
- Zhang Y, Wang Z, Ravid K. (1996) The cell cycle in polyploid megakaryocytes is associated with reduced activity of cyclin B1-dependent cdc2 kinase. *J Biol Chem.* 271(8):4266-72.
- Zhang Y, Wang Z, Liu DX, Pagano M, Ravid K. (1998) Ubiquitin-dependent degradation of cyclin B is accelerated in polyploid megakaryocytes. *J Biol Chem.* 273(3):1387-92.
- Zhang YW, Otterness DM, Chiang GG, Xie W, Liu YC, Mercurio F, Abraham RT. (2005) Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell.* 19(5):607-18.
- Zhang YW, Brognard J, Coughlin C, You Z, Dolled-Filhart M, Aslanian A, Manning G, Abraham RT, Hunter T. (2009) The F box protein Fbx6 regulates Chk1 stability and cellular sensitivity to replication stress. *Mol Cell.* 35(4):442-53.
- Zhang Y, Hunter T. (2014a) Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int J Cancer.* 134(5):1013-23.
- Zhang P, Wei Y, Wang L, Debeb BG, Yuan Y, Zhang J, Yuan J, Wang M, Chen D, Sun Y, Woodward WA, Liu Y, Dean DC, Liang H, Hu Y, Ang KK, Hung MC, Chen J, Ma L. (2014b) ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat Cell Biol.* 16(9):864-75.
- Zhang L, Wang H, Tian L, Li H. (2016) Expression of USP7 and MARCH7 Is Correlated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *J Exp Med.* 239(3):165-75.
- Zhang H, Deng T, Ge S, Liu Y, Bai M, Zhu K, Fan Q, Li J, Ning T, Tian F, Li H, Sun W, Ying G, Ba Y. (2018) Exosome circRNA secreted from adipocytes promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting deubiquitination-related USP7. *Oncogene.* 38(15):2844-2859.
- Zhao H, Watkins JL, Piwnicka-Worms H. (2002) Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(23):14795-800.

- Zhao GY, Lin ZW, Lu CL, Gu J, Yuan YF, Xu FK, Liu RH, Ge D, Ding JY. (2015) USP7 overexpression predicts a poor prognosis in lung squamous cell carcinoma and large cell carcinoma. *Tumour Biol.* 36(3):1721-9.
- Zhou J, Wang J, Chen C, Yuan H, Wen X, Sun H. (2018) USP7: Target Validation and Drug Discovery for Cancer Therapy. *Med Chem.* 14(1):3-18.
- Zhu J, Emerson SG. (2002) Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene.* 21(21):3295-313.
- Zhu L, Liu R, Zhang W, Qian S, Wang JH. (2015) MicroRNA-205 regulates ubiquitin specific peptidase 7 protein expression in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep.* 12(3):4652-4656.
- Zhu Q, Sharma N, He J, Wani G, Wani AA. (2015) USP7 deubiquitinase promotes ubiquitin-dependent DNA damage signaling by stabilizing RNF168. *Cell Cycle.* 14: 1413-1425.
- Zimmet J, Ravid K. (2000) Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol.* 28(1):3-16.
- Zlatanou A, Sabbioneda S, Miller ES, Greenwalt A, Aggathangelou A, Maurice MM, Lehmann AR, Stankovic T, Reverdy C, Colland F, Vaziri C, Stewart GS. (2016) USP7 is essential for maintaining Rad18 stability and DNA damage tolerance. *Oncogene.* 35(8):965-76.
- Zuazua-Villar P, Rodriguez R, Gagou ME, Eysers PA, Meuth M. (2014) DNA replication stress in CHK1-depleted tumour cells triggers premature (S-phase) mitosis through inappropriate activation of Aurora kinase B. *Cell Death Dis.* 5:e1253.

Annexes

Annexe 1 : Manuscrit : **Inhibition of ubiquitin-specific protease 7 sensitizes Acute Myeloid Leukemia to chemotherapy.**

Maëlle Cartel^{1,2}, Pierre-Luc Mouchel^{1,3,4}, Mathilde Gotanègre^{1,3}, Laure David^{1,2,5}, Sarah Bertoli^{1,2,4}, Véronique Mansat-De Mas^{1,2,6}, Arnaud Besson⁷, Jean-Emmanuel Sarry^{1,3}, Stéphane Manenti^{1,2,*}, Christine Didier^{1,2,*}

Affiliations :

¹ Cancer Research Center of Toulouse, INSERM U1037, CNRS ERL 5294, Université de Toulouse, Toulouse, France.

² Ligue Nationale Contre le Cancer, équipe labellisée 2016.

³ Ligue Nationale Contre le Cancer, équipe labellisée 2018.

⁴ Service d'hématologie, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopôle

⁵ Current Affiliation : IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France

⁶ Laboratoire d'hématologie, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole

⁷ LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31062 Toulouse Cedex, France.

* These authors contributed equally to this work

Corresponding Author: Christine Didier, Cancer Research Center of Toulouse, INSERM U1037, CNRS ERL 5294, Toulouse, France. E-mail: christine.didier@inserm.fr

The authors declare no potential conflicts of interest

Running Title: Targeting USP7 in AML.

words abstract: 182

tables and/or figures: 4

references: 36

Abstract (182 words)

Resistance of acute myeloid leukemia (AML) cells to therapeutic agents is frequent the mechanisms leading to this resistance must be understood and handled. In this paper, we demonstrate that pharmacological or RNA interference-mediated inhibition of deubiquitinylase USP7 significantly reduces AML cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, and increases AML cell death. Transcriptomic dataset analyses reveal that a USP7 gene signature is highly enriched in cells from AML patients at relapse, as well as in residual blasts from Patient Derived Xenograft (PDX) models treated with clinically relevant doses of cytarabine, indicating a relationship between USP7 expression and resistance to therapy. Accordingly, single cell analysis from AML patients at relapse *versus* diagnosis showed that a gene signature of the pre-existing subpopulation responsible for relapse is enriched in transcriptomes of patients with a high USP7 level. Finally, we demonstrate that USP7 inhibition synergizes with cytarabine to kill AML cell lines and primary patient cells with high USP7 levels. Altogether, these data demonstrate that USP7 represents both a marker of resistance to chemotherapy, as well as a potential therapeutic target in overcoming resistance to treatment.

Keywords (4): Acute Myeloid Leukemia, USP7, resistance, cytarabine

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) originates from the transformation and clonal expansion of undifferentiated hematopoietic progenitors, characterized by altered growth, differentiation, and proliferation capacities, which result in failure of bone marrow hematopoietic functions. Although a majority of AML patients initially respond to standard induction therapy, a protocol that combines cytarabine (AraC) with an anthracycline, relapses are common and overall survival remains very poor.¹ Whole-genome sequencing analyses have highlighted the molecular heterogeneity of AML and allow for risk-based stratification.² For some mutations resulting in oncogenic signaling, specific inhibitors have been developed and are included in clinical strategies.^{3,4} Unfortunately, in the majority of cases, these strategies show only transient and limited efficacy due to a variety of resistance mechanisms occurring in minor subpopulations of resistant leukemic cells (RLC) which can initiate relapse.⁵ Consequently, identification of these resistance mechanisms and new potential drug targets is urgently needed in AML.

Ubiquitylation is an essential post-translational (protein) modification affecting/involved in protein stability, localization, interactions, and activity. This process is tightly regulated, antagonized by cysteine protease deubiquitinating enzymes (or DUBs), and involved in multiple signaling pathways.⁶ Ubiquitin-specific protease 7 (USP7, also known as herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease, or HAUSP) belongs to the largest subfamily of DUB and is one of the best studied, disease-associated DUBs.⁷ It has been noted that USP7 participates in the regulation of apoptosis and senescence by modulating the p53 pathway, either by directly deubiquitinating p53 or by stabilizing MDM2, an E3-ubiquitin ligase that ubiquitinates and targets p53 for proteasomal degradation.⁸ Independent from its role on p53, USP7 modulates various pathways both in homeostasis or during oncogenesis by targeting a large panel of substrates, involved in cell cycle, DNA damage response, immune response, signal transduction, neuronal differentiation and epigenetic regulation.^{7,9} Therefore, it is evident that USP7 is at the center of a complex network, and recent efforts have focused on the discovery and development of small molecule inhibitors of this protein.¹⁰⁻¹⁶ These inhibitors were found to enhance apoptosis in chronic lymphocytic leukemia¹⁷ and multiple myeloma¹⁸, and to reduce neuroblastoma growth *in vivo*¹⁹. In this context, we hypothesize that a possible dysregulation of USP7 may contribute to resistance in AML.

In this study, we first showed that pharmacological or RNA interference-mediated inhibition of USP7 significantly reduced AML cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, and increased AML cell

death. Furthermore, our results demonstrate that USP7 expression is a predictive marker of resistance to chemotherapy in AML. We also found that USP7 inhibition potentiates cytarabine (AraC) treatment by increasing leukemic cell death, and independently from p53 status. Altogether, these results suggest that targeting USP7 may represent a novel therapeutic strategy in AML.

Results

Targeting USP7 in Leukemic Cell Lines.

We first investigated the impact of USP7 silencing or pharmacological inhibition on the proliferation and viability of leukemic cell lines. USP7 silencing in HL-60 cells (Fig. S1A) significantly reduced cell proliferation (Fig. 1A), by increasing apoptotic cell death (Fig. 1B) and the proportion of cells in the G1 phase (Fig. 1C).

In order to assess the importance of p53 status for this response, USP7 pharmacological inhibition (P22077) was then tested in both HL-60 (p53-) and OCI-AML3 (p53+) cell lines (Fig. 1D-F and 1G-I, respectively). This confirmed the results obtained by RNA interference, and indicated that the p53 pathway is likely not involved in these USP7 inhibition effects on leukemic cells. As a control of USP7 pharmacological inhibition efficiency, we demonstrated that polyubiquitination of the serine-threonine kinase CHK1, one of the USP7 well-described substrate^{20,21}, was increased, and that in turn, CHK1 protein level was decreased in both leukemic cell lines (Fig. S1B-E).

Then, the effect of USP7 inhibition *in vivo* was studied in an AML xenograft model. Briefly, 2 million OCI-AML3 cells were injected into the tail vein of immunodeficient adult NSG mice after pre-conditioning with a sub-lethal treatment of busulfan one day prior to injection, in order to establish AML disease. USP7 inhibitor treatment by intraperitoneal injection over the span of 5 days significantly improved overall mouse survival (***p=0.0001) compared to vehicle-treated mice (Fig. 1J). Taken together, these results show that USP7 inhibition significantly reduces leukemic cells proliferation and impairs their viability *in vitro* and *in vivo*.

USP7 Inhibition Impacts Primary AML Cell Viability Without Affecting Normal Cells.

We then performed similar experiments on primary AML cells and normal peripheral blood mononuclear cells (PBMC). As shown in Fig. 2A, USP7 inhibition with P22077 significantly reduced cell viability in three different primary AML samples, while PBMCs were barely unaffected by the treatment. It should be noted that primary AML and PBMCs classically do

not proliferate under these culture conditions. Altogether, these results suggest that USP7 controls leukemic cell viability without affecting normal hematopoietic cell survival.

Subsequently, to study the effect of the USP7 inhibition *in vivo*, we used the patient-derived xenografts (PDX) model. Briefly, 3 million unsorted primary AML cells were injected into adult NSG mice (6-9 weeks) after pre-conditioning with a sub-lethal treatment of busulfan one day prior to injection. Engraftment efficiency was monitored in peripheral blood by flow cytometry analysis of human CD45⁺, CD33⁺ positive cells at 22 weeks after xenotransplantation (Fig. 2B) before starting treatment and for cohort randomization. Mice showing at least 20 AML human blasts per μ L of peripheral blood were assigned to experimental groups in order to obtain balanced average engraftment levels in each cohort at initiation of therapy (Fig. 2C). PDX mice were treated by intraperitoneal injection with 15mg/kg P22077, three times per week over 2 weeks and daily over one week (Fig. 2B). After 3 weeks of treatment, a significant reduction in total cell tumor burden in bone marrow and spleen was observed in USP7 inhibitor-treated *versus* untreated mice (Fig. 2 D). In addition, a significant reduction in spleen size was monitored in USP7 inhibitor-treated mice compared to untreated mice (Fig. 2 E-F). It is important to note that P22077 was used at a well-tolerated dose, as monitored by body weight of the mice and the viability of normal hematopoietic murine cells (Fig. 2G-H).

USP7 Abundance, Transcriptomic Gene Signature and AML Patient Outcome.

We then investigated USP7 protein levels in a cohort of 57 primary AML samples by western blot analysis. 10 of these samples were not usable (degraded or presenting not enough actin signal, annotated as Not Included (NI) in fig. S2A); therefore, we performed the analysis on 47 patient samples. As shown in Fig. 3A and in all the samples in fig. S2A, USP7 protein level is highly variable in AML samples. Interestingly, similar analysis was performed in a panel of 6 AML cell lines (fig. S2B) and the same heterogeneous expression was shown.

Given our results and that USP7 has been implicated in transcription regulation^{15,18,22}, our next step was to consider whether high USP7 abundance AML cells display a specific *USP7*-related transcriptomic signature. To test this hypothesis, USP7 abundance (transcript and protein) was quantified in AML patient samples. We found that *USP7* transcript abundance and USP7 protein levels are highly correlated ($R=0.8073$, $^{**}p=0.0085$) (Fig. 3B). We then defined a *USP7*-specific gene signature (41 genes up-regulated, table S1) from The Cancer Genome Atlas transcriptomic database²³, and found that this signature is highly enriched in the transcriptome of AML patient samples at relapse (HACKL cohort, GEO: GSE6891²⁴) (Fig. 3C). We also

observed a similar enrichment in transcriptomes of cytarabine-resistant human AML cells purified from Patient-Derived Xenograft (PDX) models treated with clinically relevant doses of cytarabine (GEO: GSE97631²⁵) (Fig. 3D). These data highlight a correlation between high *USP7* transcriptomic signature and AML cells resistance to chemotherapeutic drugs. Therefore, *USP7* signature could represent a new predictive marker of chemoresistance and relapse in AML.

To further characterize the heterogeneity of primary AML samples, we performed single cell RNA sequencing of AML cells collected either at diagnosis or at relapse from an AML patient (IM10) (Fig. S2C) treated with a combination of anthracycline and cytarabine. Based on the difference in their gene expression, we identified two distinct transcriptional clusters of cells at diagnosis and relapse (Fig. 3E), and observed that at relapse, the decrease was striking in cluster 2 compared to cluster 1 (Fig. 3E, right panel), which implies that the signature of cluster 1 corresponds to the gene signature of the chemoresistant cells in this patient. Interrogation of two publicly available transcriptomic datasets established from AML patients at diagnosis (TCGA Network, 2013²³, and Verhaak data base GSE6891²⁶) revealed that this chemoresistant gene signature was enriched in AML samples with high *USP7* abundance (Fig. 3F and 3G). *USP7* protein abundance was high in primary cells from this patient (Fig. S2C), which is consistent with the data described above. These data strongly suggest that high *USP7* levels are associated with chemoresistance in AML cells, and with the initiation of relapse following standard chemotherapeutic treatment. Taken together, these data reveal that this high *USP7* signature is a predictive marker of resistance and relapse in AML cell.

Targeting *USP7* Overcomes Cytarabine Resistance in AML.

To explore and confirm whether *USP7* participates in the chemoresistance of leukemic cells, we examined the capacity of sensitizing HL60 and OCI-AML3 cells to cytarabine (AraC) treatment through *USP7* inhibition. As shown in Figure 4A and B, P22077 synergistically (Fig. S3A) enhanced cell death induced by cytarabine in these resistant cell lines *in vitro*, independent from p53 status.

To gain further support, we quantified the capacity of primary AML cells to form colonies in a methylcellulose-based semi-solid medium, when exposed to clinically relevant concentrations of cytarabine (10 nM) combined with the P22077 inhibitor (Fig. 4C-D). Based on the median expression of *USP7* protein, we separated this cohort into two groups of high *USP7* and low *USP7* expressing samples. Leukemic cells with high *USP7* levels (Fig. 4C) tend to be more

resistant to cytarabine compared to cells expressing lower amounts of USP7 (Fig. 4D), which is consistent with our transcriptomics analyses (Fig. 3). It is striking to note that USP7 inhibition potentiated the effects of cytarabine in cells that expressed high levels of USP7, leading to reduced colony formation, while it did not modify the sensitivity to cytarabine of cells that expressed low amounts of USP7. Our results indicate that P22077 significantly enhances the cytotoxic effect of cytarabine on leukemic cells by reducing their colony-forming potential. As previously described, *CHEK1* expression is an independent prognostic marker in AML and its protein abundance correlates with resistance to cytarabine in primary AML cells.²⁷ In order to determine whether USP7 participates in chemoresistance of leukemic cells by modulation of CHK1 stability, we next monitored the CHK1/USP7 association by Proximity Ligation Assay (PLA) in AML cells treated with cytarabine. A significant increase of the proximity between the two proteins was visualized in cytarabine-treated HL60 cells (Fig. 4E-F). The specificity of the interaction was confirmed by using a USP7 inhibitor (P22077) that induced a significant decrease in CHK1 protein level (Fig. S1C), dramatically reducing the number of PLA dots per cell (Fig. 4E-F). Similar results were obtained with the combination of cytarabine and P22077. Altogether, these data suggest a role for USP7 in promoting CHK1 stability in response to DNA damaging treatment.

Accordingly, we further examined whether a USP7/CHK1 axis is involved in AML cells chemoresistance, by measuring cell death in response to CHK1 inhibitor (SCH900776) treatment alone or in combination with cytarabine and P22077 (Fig. 4G). As described earlier (Fig. 4A-B), P22077 significantly increased cell death after cytarabine treatment. Interestingly, the addition of SCH900776 in P22077 and cytarabine-treated cells did not increase cell death, suggesting that P22077-induced cell death is mediated by the USP7/CHK1 axis. Despite the large spectrum of USP7 substrates, we showed that the cytotoxic effect caused by USP7 inhibition is mediated, at least in part, by a decrease in CHK1 expression. Altogether, these results indicate that P22077 could be a relevant anti-leukemic drug in overcoming chemoresistance.

Discussion

Recent studies have reported that the USP7 level is elevated in several types of tumors, and that USP7 overexpression is often predictive of poor prognosis ^{9,22,28,29}. Several studies consequently suggested USP7 as an attractive pharmaceutical target for various cancers, and pharmacological inhibitors of this enzyme have recently been developed ⁹⁻¹⁶. In this study, we revealed that USP7 plays a key role in AML chemoresistance. Furthermore, we observed heterogeneous USP7 levels in AML cell lines and primary samples, and established that patients with a high USP7 signature were more prone to chemoresistance and relapse. Experiments using single cell analysis support these findings by showing that the resistant gene signature is enriched in AML samples that exhibit high USP7 levels, which reveals that this chemoresistant cell population pre-exists at diagnosis and is enriched following first line treatment. Consequently, these data suggest that USP7 could be a new prognostic marker and a potential therapeutic target for AML. Our finding that USP7 inhibition *in vitro* and *in vivo* significantly suppresses leukemic cell growth, alone and in combination with chemotherapy, independently from p53 status, supports this notion. Although, p53 can be stabilized by USP7 ⁸, it appears that in AML, which do not frequently present p53 mutations, cells do not rely on p53 stabilization. Despite the large spectrum of USP7 substrates, we showed that the cytotoxic effect caused by USP7 inhibition is mediated, at least in part, by a decrease in CHK1 function due to the fact that we observed similar anti-leukemic effects with the CHK1 inhibitor SCH900776. Based on our recent study, in which we showed that high CHK1 protein levels contribute to cellular resistance to cytarabine, in part by facilitating fork progression or stalled fork restart ²⁷ and based on the present results, we now suggest that high CHK1 levels, stabilized by USP7, allow cells to survive by enabling them to adapt to DNA replication stress induced by cytarabine treatment. Therefore, we believe that dysregulation of a USP7/CHK1 axis may be a new “Achilles heel” in AML cells. In fact, USP7 inhibition has a profound impact on proliferation and viability in leukemic cells that express high USP7 levels compared to cells that express low USP7 levels or in peripheral blood mononuclear cells. This characteristic could provide a useful therapeutic window in which this class of inhibitors could be proposed for clinical trials.

Although we documented the heterogeneity of USP7 abundance in primary AML samples, the mechanisms by which USP7 protein and mRNA expressions are controlled in leukemic cells remain to be defined. It will be important to investigate the mechanisms that control USP7 expression in the context of AML heterogeneity. We established that USP7 transcript and protein abundance are highly correlated in AML samples, which suggests that the majority of

USP7 regulation might occur at the transcriptional level. Previous reports have documented the transcriptional regulation of *USP7*, for instance in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) in which the transcription factor NOTCH1 induces *USP7* gene expression, and where USP7 controls the stability of NOTCH1 and the JMJD3 histone demethylase through a positive regulatory loop^{30,31}. It is noteworthy that the NOTCH-signaling pathway has been reported to play oncogenic and tumor suppressor functions in the hematopoietic system, although the biological and clinical relevance remains unclear in AML³². A potential regulatory and functional link between USP7 and NOTCH1 is supported by our transcriptomic analyses seeing as Delta like non-canonical Notch ligand 1 (DLK1) was up-regulated in cells enriched in USP7 gene signature. *DLK1* encodes the NOTCH activator Delta1 which is involved in primary and model AML cell growth³³. Furthermore, previous analyses show a significantly shorter survival of patients with high NOTCH1 or Delta1 expression, suggesting that activation of the NOTCH pathway may be associated with a poor prognosis in AML^{34,35}. All these studies, combined with our data, suggest the existence of a NOTCH/USP7/CHK1 axis involved in AML chemoresistance, which should be investigated in future studies.

Finally, the large spectrum of USP7 substrates and its implication in fundamental cellular and developmental processes define USP7 as a molecule of great importance. Depending on its targeted substrates and on the cellular context, USP7 may be either a tumor suppressive or an oncogenic protein. Consequently, it will be important to understand how the acute leukemic cells hijack USP7 functions.

In summary, our study provides evidence that USP7 is an important component/regulator in chemoresistant AML cells. Moreover, a combination of a USP7 inhibitor with cytarabine induces synergistic anti-leukemic activity. Overall, our study opens the possibility that targeting USP7 is a promising therapeutic strategy in treating Acute Myeloid Leukemia and supports the inclusion of USP7 inhibitors in clinical trials aimed at overcoming chemoresistance in AML.

Materials and Methods

Cell Lines, AML Samples and Treatments

Human leukemic cell lines HL-60 were cultured in RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and OCI-AML3 were cultured in MEM α medium with Glutamax. All media were supplemented with 20% fetal bovine serum, and cells were maintained at 37°C with 5% CO₂.

Thawed samples (or derivative products, such as DNA and RNA) from 57 AML patients were analyzed for CHEK1 mRNA and CHK1 protein abundance after informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The samples were stored in the HIMIP collection (BB-0033-00060). In conformance with French law, the HIMIP collection was declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection1) and obtained by transfer agreement (AC 2008-129) after approval by ethical committees (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II and the APHP ethical committee). Clinical and biological annotations of the samples were declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés). For AnnexinV assays after USP7 inhibitor treatment, primary AML cells were cultured over 24h in Iscove Modified Dulbecco Media (IMDM), supplemented with 20% fetal bovine serum.

The USP7 inhibitor, P22077, was purchased from Selleck Chemicals (S7133, Selleckchem, Houston, USA) and stored in DMSO at 10mM. CHK1 inhibitor SCH900776 was purchased from Clinisciences (CliniSciences, Nanterre, France). TUH Pharmacy (Toulouse, France) was kind enough to provide us with Cytarabine (AraC).

Antibodies

Experiment	Company	Protein recognized	Antibody reference
Western Blot	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	CHK1	clone G-4, cat. no. sc-8408
		HA	clone F-7, cat. no. sc-7392
		p53	clone DO-1, cat. no. sc-126
	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	Ubiquitin	clone P4D1, cat. no. 3936
		γ H2AX phosphoS139	#2577
	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA	USP7	clone 33A, cat. no. A300-033A
	Millipore, Billerica, MA, USA	Actin	cat. no. MAB1501
Proximity Ligation Assay	Proteintech, Rosemont, USA	CHK1	10362-1-AP
	Merck, Darmstadt, Germany	USP7	PLA0306
Immunofluorescence	Merck, Darmstadt, Germany	CHK1	DSC-310, cat. no. C-9358

siRNA Transfection

The transfection of small interfering RNA (siRNA) was carried out using the Neon transfection system (Life technologies), according to the manufacturer's recommendations. 500 nM of siRNA was used per condition. RNA interference-mediated gene knockdown was achieved using pre-validated siRNA sequences from Sigma (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) for the specific siRNAs for CHK1 (sens GAAGCAGUCGCAGUGAAGA) and USP7 (sens CCCAAAUUAUCCGCGGCAAA), and Eurogentec (Eurogentec, Seraing, Belgium).

Western Blot

The procedures used for gel electrophoresis and immunoblotting have been described previously.²⁷ Primary antibodies were detected using the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (horseradish peroxidase, HRP, Promega). Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) (GE Healthcare) with a Pxi 4 (Syngene-Ozyme) imaging system and analyses were done using GeneTools software (Syngene).

Flow Cytometry

To determine the number of apoptotic cells, cells were washed then resuspended in annexin V binding buffer (BD Pharmingen). Annexin V-FITC and cell viability 7AAD dye were added and cells were incubated for 10 min in the dark.

To analyze the cell cycle distribution, cells were washed once in 1X PBS, resuspended in 70% cold ethanol, and then kept for 2h at -20°C. Cells were then incubated in 1X PBS with propidium iodide (PI) and RNase A, and cells were incubated for 2h in the dark at 4°C. Data were acquired on a Macsquant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) flow cytometer. Analyses were performed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, version 10).

Immunofluorescence

For proximity ligation assays (PLA), cells were washed twice with 1X PBS, fixed with 4% PFA, then permeabilized. AML cells were seeded on coverslips pretreated with Cell Tack (ref 354240, lot 7033571, Corning). The following steps are described in Adam et al. using Duolink kit from Sigma. The PLA signal was detected with a Zeiss confocal microscope (LSM 780). A series of Z-stack confocal microscopy images was taken and quantification of the images was carried out using ImageJ software.

For immunofluorescence, the staining protocol used is described in David and al.⁶

Clonogenic Assay

Clonogenic assay was performed on different AML primary samples, as previously described.²⁷

Quantitative PCR

Total RNA was extracted from frozen cells stored in 1ml of TRI Reagent RNA/DNA/protein isolation reagent (Molecular Research Center). The extraction was done as previously described.²⁷ RNA purity and concentration were monitored with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., ThermoFisher Scientific). cDNAs were synthesized from 1 µg total RNA using SuperScript III Reverse transcription (Invitrogen). Real-time qPCRs were performed on a StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) with a TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). The primer used was Hs00931763_m1 (Applied Biosystem) for USP7. GUSB (Hs00939627_m1) and B2M (Hs00984230_m1) were used as housekeeping genes. Results were analyzed with the stepOnePlus™ software v2.2.2 using the conventional $\Delta\Delta C_t$ method.

Statistical Analysis

At least three independent experiments were carried out to generate each dataset and statistical analyses were performed as described in the figures, using the Prism software package (GraphPad Software). Results are expressed as means \pm s.e.m. Differences were considered significant for the following p-values: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

Tumor Xenografts in NOD SCID Gamma (NSG) Mice

NOD/LtSz-SCID/ IL-2R γ chain null (NSG) mice were bred at the UMS006 in Toulouse (France) using breeders obtained from Charles River. All animal experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Ethics Committee of the UMS006 and the Midi-Pyrénées Region (approval 2017071314596526). Mice (6–9 weeks old) were sublethally treated with busulfan (30 mg/kg) 24h before injection of leukemic cells. Leukemic OCI-AML3 cell line was thawed at room temperature, washed twice in PBS, and suspended in Hanks balanced salt solution at a final concentration of 2 million cells per 200 µL of Hanks balanced salt solution per mouse for tail vein injection. Twenty-two days after injection, the mice were randomly split into 2 groups: one group was treated with 100 µl corn oil with 10% DMSO as a vehicle (n=7), and one group was treated with 30 mg/kg of P22077 diluted in 100 µl corn oil with 10% DMSO (n=8). Mice were treated by daily IP injections of P22077 or the vehicle for

5 days. Daily monitoring of mice for symptoms of disease (ruffled coat, hunched back, weakness and reduced mobility) determined the time of killing animals with signs of distress. NSG mice were humanely killed in accordance with European ethic protocols. Overall mouse survival was established under these conditions.

For Patient Derived Xenograft, NSG mice (6–9 weeks old) were sublethally treated with busulfan (30 mg/kg) 24h before injection of human leukemic cells. Mice were engrafted by an injection of 3×10^6 primary AML cells in the tail vein. Twenty-two weeks after injection, peripheral blood was obtained to determine the fraction of human blasts using flow cytometry. Mice were then randomly split into 2 groups: one group was treated with 100 μ l PBS containing 10-15% DMSO as a vehicle (n=6), and one group was treated with 15 mg/kg of P22077 diluted in 100 μ l PBS with DMSO (n=7). Mice were treated 3 days per week over 2 weeks and daily over 1 week by IP injections. NSG mice were humanely killed in accordance with European ethic protocols. Bone marrow (mixed from tibias and femurs) and spleen were dissected in a sterile environment and flushed in Hanks balanced salt solution with 1% FBS. Blasts from bone marrow and spleen were labeled with FITC-conjugated anti-hCD3, PE-conjugated anti-hCD33, PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mCD45.1, and APC-H7-conjugated anti-hCD45 (all antibodies from Becton Dickinson, BD, except FITC-conjugated anti-hCD3 from Ozyme Biolegend) to determine the fraction of human blasts (hCD45+mCD45.1–hCD33+ cells) using flow cytometry. Analyses were performed on a Life Science Research II (LSR II) flow cytometer with DIVA software (BD). The number of AML cells in total cell tumor burden (in bone marrow and spleen) were determined by using CountBright beads (Invitrogen) via described protocol.

RNA Sequence Analysis

Single-Cell Transcriptomics.

Blood cells were collected from one patient at diagnosis and at relapse following chemotherapeutic induction. AML cells were purified by ficoll centrifugation and AML blast cells were then sorted based on the expression of CD45+, CD33+ and ANNEXIN-. Five hundred (500) cells were used per condition for 10xGenomics single cell assaying as recommended by 10xGenomics. Sequencing was performed with an Illumina High seq 3000. The raw data were clustered with the 10xGenomics cell ranger pipeline.

Transcriptomic Signatures and Datamining.

Two USP7 signatures were generated from transcriptomes of AML patients with high *versus* low expression of USP7 from two independent databases (TCGA Network, 2013 ²³, and Verhaak data base GSE6891²⁶). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using USP7 signature was performed from the relapse and diagnosis transcriptomes according to Hackl et al. ²⁴, the high and low responder in mice according to Farge et al. ²⁵ and the LSC and bulk transcriptomes according to Eppert et al. ³⁶. The analysis was performed using the Broad Institute GSEA3.0 software.

Acknowledgements

We would like to sincerely thank Thomas Farge for his technical support during *in vivo* experiments. We thank Laetitia Ligat at the CRCT microscopy facility and Manon Farcé at the CRCT cytometry facility for their helpful discussions of the analyses. We would also like to thank Véronique De Mas, Cécile Demur and Eric Delabesse for the management of the BRC-HIMIP Biobank (Biological Resources Centres-INSERM Midi-Pyrénées “Cytothèque des hémopathies malignes”). We gratefully acknowledge Dr Ze’ev Ronai for the critical review of the manuscript, and sincerely thank all members of the “cell cycle and cancer” team for their critical review during the entire study. The authors sincerely thank Chloé Laplagne for the technical PBMC preparation. Maëlle Cartel is a recipient of the Ligue Nationale contre le Cancer.

Authors’ Contributions:

M.C., P.L.M., M.G., L.D., J.E.S., S.M., and C.D. conceived and designed the study; M.C., P.L.M., M.G., L.D. and C.D. performed experiments; S.B. and V.MDM. contributed clinical samples; M.C., A.B., J.E.S., S.M. and C.D. wrote the manuscript; A.B., J.E.S., S.M. and C.D. insured administrative, technical and material support; S.M. and C.D. supervised the project.

References

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* **373**: 1136–1152 (2015).
2. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* **374**(23):2209-2221 (2016).
3. Yang M, Zhao J, Liu T, et al. Use of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia remission induction or salvage therapy: systematic review and meta-analysis. *Cancer Manag Res.* 10:2635-2652 (2018).
4. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med.* 378(25):2386-2398 (2018).

5. Zhou J, Chng WJ. Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Molecular Mechanisms and Resensitizing Strategies. *World J Clin Oncol.* 9(5):90-97 (2018).
6. Harrigan JA, Jacq X, Martin NM, Jackson SP. Deubiquitylating Enzymes and Drug Discovery: Emerging Opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 17(1):57-78 (2018).
7. (15) Basu B, Saha G, Choudhury SG, Ghosh MK. Cellular homeostasis or tumorigenesis: USP7 playing the double agent. *Cancer Cell Microenv.* 4: e1624 (2017).
8. Li M, Brooks CL, Kon N, Gu W. A Dynamic Role of HAUSP in the p53-Mdm2 Pathway. *Mol Cell.* 13(6):879-886 (2004).
9. Bhattacharya S, Chakraborty D, Basu M, Ghosh MK. Emerging Insights into HAUSP (USP7) in Physiology, Cancer and Other Diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 3:17 (2018).
10. D'Arcy P, Wang X, Linder S. Deubiquitinase Inhibition as a Cancer Therapeutic Strategy. *Pharmacol Ther.* 147:32-54 (2015).
11. Kategaya L, Di Lello P, Rougé L, et al. USP7 Small-Molecule Inhibitors Interfere with Ubiquitin Binding. *Nature.* 550(7677):534-538 (2017).
12. Turnbull AP, Ioannidis S, Krajewski WW, et al. Molecular Basis of USP7 Inhibition by Selective Small-Molecule Inhibitors. *Nature.* 550(7677):481-486 (2017).
13. Lamberto I, Liu X, Seo HS, et al. Structure-Guided Development of a Potent and Selective Non-Covalent Active-Site Inhibitor of USP7. *Cell Chem Biol.* 24(12):1490-1500 (2017).
14. Pozhidaeva A, Valles G, Wang F, et al. USP7-Specific Inhibitors Target and Modify the Enzyme's Active Site via Distinct Chemical Mechanisms. *Cell Chem Biol.* 24(12):1501-1512 (2017).
15. Desroses M, Altun M. The Next Step Forward in Ubiquitin-Specific Protease 7 Selective Inhibition. *Cell Chem Biol.* 24(12):1429-1431 (2017).
16. Gavory G, O'Dowd CR, Helm MD, et al. Discovery and Characterization of Highly Potent and Selective Allosteric USP7 Inhibitors. *Nat Chem Biol.* 14(2):118-125 (2018).
17. Carra G, Panuzzo C, Torti D, et al. Therapeutic Inhibition of USP7-PTEN Network in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Strategy to Overcoming TP53 Mutated/Deleted Clones. *Oncotarget.* 8(22):35508-35522 (2017).
18. Chauhan D, Tian Z, Nicholson B, et al. A Small Molecule Inhibitor of Ubiquitin-Specific Protease-7 Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells and Overcomes Bortezomib Resistance. *Cancer Cell.* 22(3):345-58 (2012).
19. Fan YH, Cheng J, Vasudevan SA, et al. USP7 Inhibitor P22077 Inhibits Neuroblastoma Growth via Inducing p53-Mediated Apoptosis. *Cell Death Dis.* 4:e867 (2013).
20. Alonso de Vega I, Martin Y, Smits VAJ. USP7 Controls Chk1 Protein Stability by Direct Deubiquitination. *Cel Cycle.* 13:3921-3926 (2014).
21. Zhang P, Wei Y, Wang L, et al. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat Cell Biol.* 16(9):864-75 (2014).
22. An T, Gong Y, Li X, et al. USP7 Inhibitor P5091 Inhibits Wnt Signaling and Colorectal Tumor Growth. *Biochem Pharmacol.* 131:29-39 (2017).

23. Network TCGAR. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult de novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 368:2059–74 (2013).
24. Hackl GEO: GSE6891 (2011).
25. Farge T, Saland E, de Toni F, et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* 7(7):716-735 (2017).
26. Verhaak RGW, Wouters BJ, Erpelinck CAJ, et al. Prediction of Molecular Subtypes in Acute Myeloid Leukemia Based on Gene Expression Profiling. *Haematologica.* 94:131–4 (2009).
27. David L, Fernandez-Vidal A, Bertoli S, et al. CHK1 as a Therapeutic Target to Bypass Chemoresistance in AML. *Sci Signal.* 9(445). (2016).
28. Zhao GY, Lin ZW, Lu CL, et al. USP7 Overexpression Predicts Poor Prognosis in Lung Squamous Cell Carcinoma and Large Cell Carcinoma. *Tumour Biol.* 36(3):1721-9 (2015).
29. Ma M, Yu N. Ubiquitin-Specific Protease 7 Expression is a Prognostic Factor in Epithelial Ovarian Cancer and Correlates with Lymph Node Metastasis. *Onco Targets Ther.* 9:1559-69 (2016).
30. Shan H, Li X, Xiao X, et al. USP7 Deubiquitinates and Stabilizes NOTCH1 in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Signal Transduct Target Ther.* 3:29 (2018).
31. Jin Q, Martinez CA, Arcipowski KM, et al. USP7 Cooperates with NOTCH1 to Drive the Oncogenic Transcriptional Program in T Cell Leukemia. *Clin Cancer Res.* 25(1):222-239 (2018).
32. Lobry C, Oh P, Mansour MR, Look AT, Aifantis I. Notch Signaling: Switching an Oncogene to a Tumor Suppressor. *Blood.* 123(16):2451-9 (2014).
33. Wang S, Itoh M, Shiratori E, Ohtaka M, Tohda S. NOTCH Activation Promotes Glycosyltransferase Expression in Human Myeloid Leukemia Cells. *Hematol Rep.* 10(3):7576 (2018).
34. Xu X, Zhao Y, Xu M, et al. Activation of Notch Signal Pathway is Associated with a Poorer Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *Med Oncol.* 28:483-9 (2011).
35. Kanga PT, Bassi G, Cassaro A, et al. Notch Signaling Drives Bone Marrow Stromal Cell-Mediated Chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia. *Oncotarget.* 7(16):21713-27 (2016).
36. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, et al. Stem Cell Gene Expression Programs Influence Clinical Outcome in Human Leukemia. *Nat Med.* 17:1086–93. 45 (2011).

Figures legends

Fig. 1: USP7 Inhibition Impacts Leukemic Cell Proliferation and Viability *in Vitro* and *in Vivo*

A: HL-60 cells were transfected with the control (CTL) or USP7 siRNA for 48h, cell quantity was then assessed by Trypan Blue staining. For statistical analyses, a nonparametric *t*-test was used. * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.01$. *n*=5. **B:** In similar experiments to the data in A, cell death was assessed by flow cytometry with annexinV/cell viability staining, using a MACSQuant VYB flow cytometer and raw data were analyzed with FlowJo software. Data represent the mean \pm s.e.m. of 4 experiments. Statistical significance was determined by student's unpaired *t*-test. **C:** In similar experiments as described in A, cell cycle distribution was determined using propidium iodide (PI) staining and analyzed by flow cytometry using a MACSQuant VYB flow cytometer and completed by analyses with FlowJo software. Representative cell cycle distribution profiles from 3 independent experiments are shown. **D:** HL-60 cells were treated as indicated and, 48h after, cell quantity was assessed by trypan blue staining. Statistical analyses were performed as in A (*n*=5). **E:** In similar experiments to the data in D, cell death was assessed by flow cytometry using annexinV/cell viability staining. Statistical significance was determined as in B, (*n*=3). **F:** In similar experiments to the data in D, cell cycle distribution was determined using propidium iodide (PI) staining. Representative cell cycle distribution profiles from 3 independent experiments are shown. **G:** OCI-AML3 cells were treated as indicated and, 48h after, the number of cells was assessed by Trypan Blue staining. Statistical analyses were performed as in A (*n*=6). **H:** In similar experiments to the data in G, cell death was assessed by flow cytometry using annexinV/cell viability staining. Statistical significance was determined as in B, (*n*=5). **I:** In similar experiments to the data in G, cell cycle distribution was determined using propidium iodide (PI) staining. Representative cell cycle distribution profiles from 3 independent experiments are shown. **J:** Kaplan–Meier curves of mice survival were established for NSG mice engrafted with OCI-AML3, and treated with P22077 (30 mg/kg/day) or the vehicle (DMSO + corn oil) for 5 days. For statistical analysis, a Mantel-Cox test was used. *** $P \leq 0.001$.

Figure 1

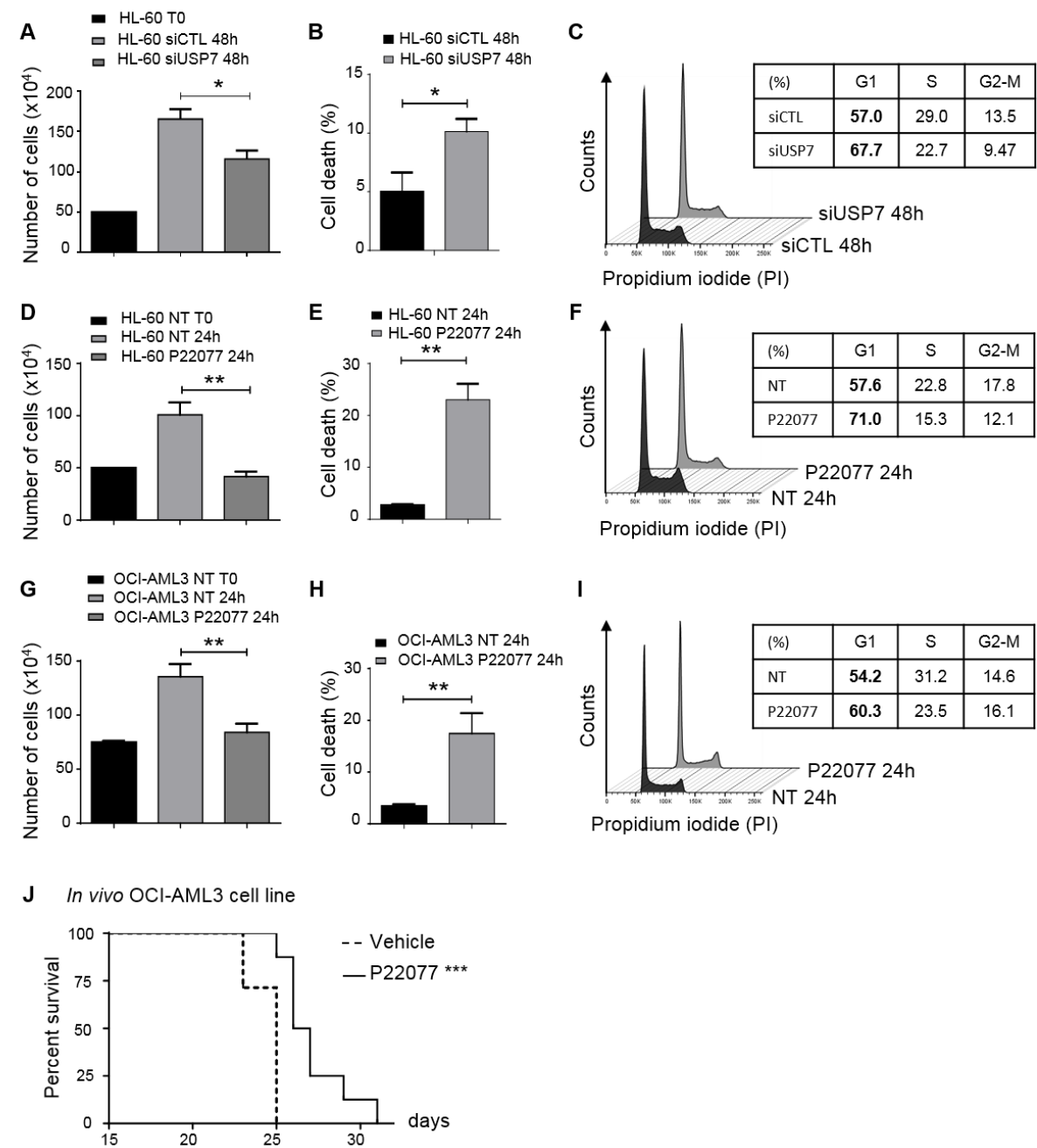


Fig. 2: USP7 Inhibition Impacts Primary Leukemic Cell Proliferation and Viability *in Vitro* and *in Vivo*, without Impacting Normal Cells.

A: Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC, n=3) and AML primary samples (n=3) were treated with 10 μ M P22077 for 24 h, and cell viability was assessed by flow cytometry with annexinV/cell viability staining, using a MACSQuant VYB flow cytometer and data were analyzed with FlowJo software. **B:** Schematic diagram of the therapy regimen and schedule used to treat NSG-based PDX models with P22077. Peripheral blood engraftment was assessed after 22 weeks and mice were assigned to experimental groups. 6 mice were treated with vehicle (PBS + DMSO) or 15mg/kg/day P22077 given *via* intraperitoneal. After 3 weeks of treatment, mice were sacrificed in order to characterize viable residual AML cells. **C:** Engraftment efficiency was measured in peripheral blood by flow cytometry analysis at 22 weeks after xenotransplantation. Mice showing at least 20 AML human blasts/ μ L of blood were assigned to experimental groups to obtain balanced average engraftment levels in each cohort at initiation of therapy. 6 mice were assigned in vehicle group and 7 mice were assigned in P22077 treatment group. For statistical analyses, a *t*-test was used, ns = not significant. **D:** Total number of human viable AML cells expressing CD45+ and CD33+ was analyzed and quantified using flow cytometry in P22077-treated AML-xenografted mice compared to vehicle-treated AML-xenografted mice in bone marrow and spleen (total cell tumor burden in millions). For statistical analysis, a nonparametric *t*-test was used. * $P \leq 0.05$. **E** and **F:** Spleen size was monitored in USP7 inhibitor condition (P22077, n=7) compared to untreated mice (Vehicle, n=6). For statistical analysis, a nonparametric *t*-test was used. ** $P \leq 0.01$ **G:** The body weight of the mice was monitored during the experiment. Mean of each group is presented, discriminating male and female mice. **H:** Murine viable cells were measured by flow cytometry analysis (CD45.1+ AnnV- cells) to determine the toxicity of P22077. For statistical analyses, a *t*-test was used, ns = not significant.

Figure 2

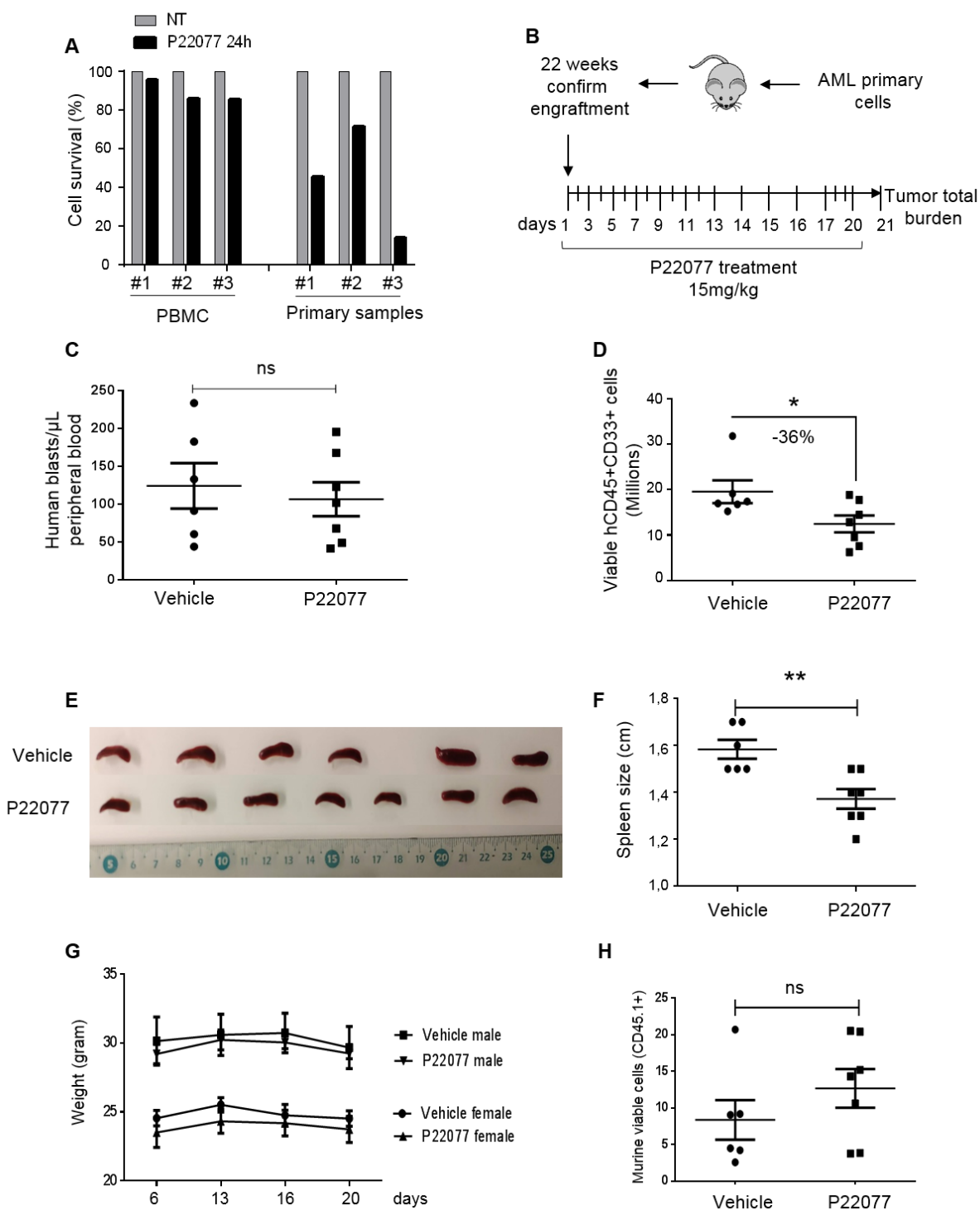


Fig. 3: USP7 Gene Expression and Transcriptomic Gene Set.

A: USP7 protein levels were determined by immunoblotting in 57 primary AML samples. Actin was used as the loading control, and extracts from KG1a leukemic cell line served as a between-gel control. A representative western blot of the 57 AML samples is presented, and total USP7 protein level quantification is reported. **B:** Linear regression analysis for the correlation between *USP7* mRNA level and USP7 protein level, analyzed in 9 AML primary samples. **C:** GSEA of the high *USP7* gene signature in transcriptomes of patients with AML at relapse (red) compared with diagnosis (blue). **D:** GSEA of the high *USP7* gene signature in transcriptome of patients with AML that are low (red) compared with high (blue) responders in PDX models. **E:** SNE plot of scRNAseq data with cells colored according to K-means cluster assignment of the cells from IM10 at diagnosis, and relapse. **F:** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of cluster 1 signature generated using the cells at diagnosis and relapse was performed from the transcriptomes of the TCGA database. **G:** Same analysis as in F was performed from the transcriptome of the Verhack database.

Figure 3

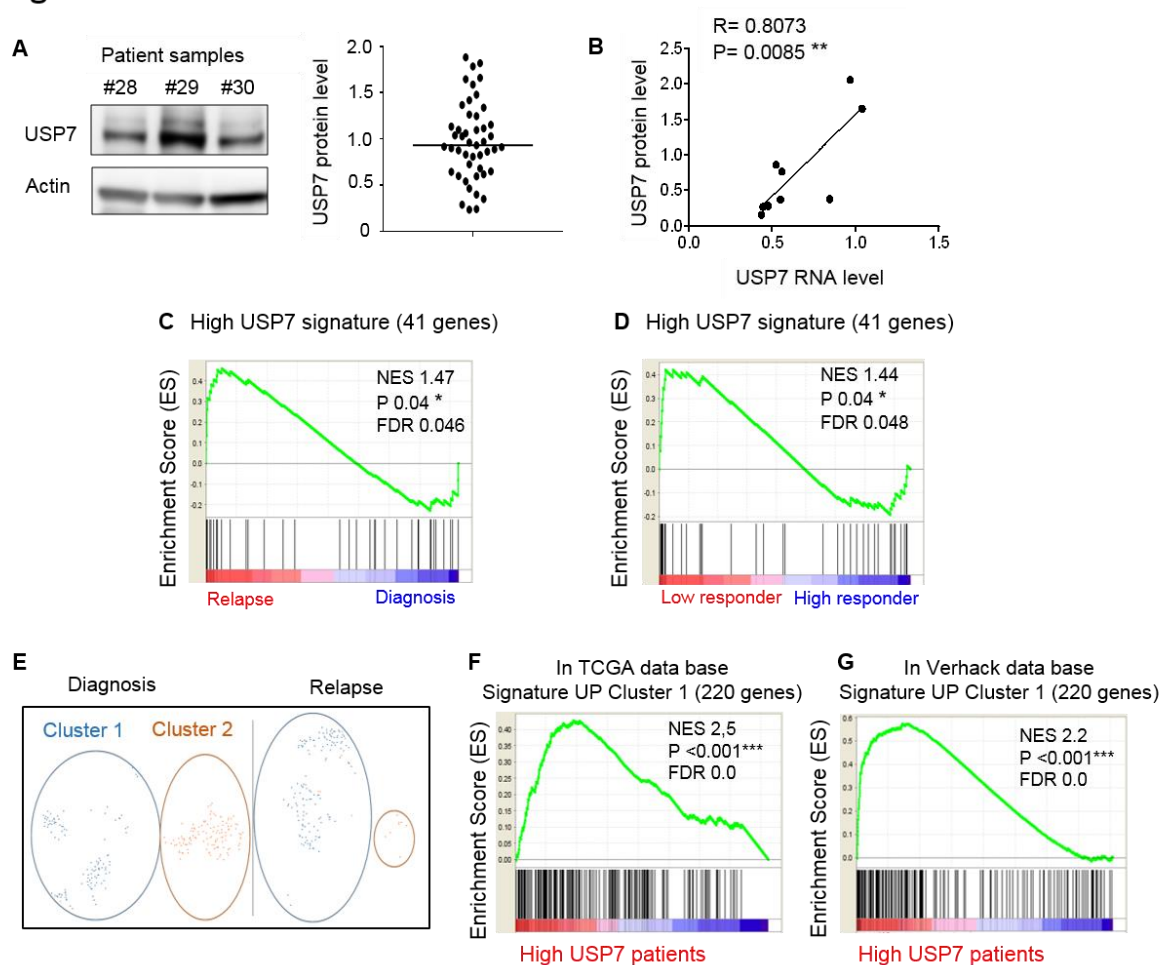


Figure 4: USP7 Inhibition Potentiates Cytarabine Treatment in AML Cells.

A: HL-60 cells were treated with P22077 (10 μ M), cytarabine (AraC, 300nM) or the combination of both drugs, for 24 h. Cell death was assessed by flow cytometry with annexinV/cell viability staining using a MACSQuant VYB flow cytometer and FlowJo software. Statistical analysis was performed by unpaired *t*-test (n=4). * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.01$.

B: OCI-AML3 cells were treated as indicated for 24 h. Cell death was assessed as in A. Statistics were established by unpaired *t*-test (n=3). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and ns = not significant.

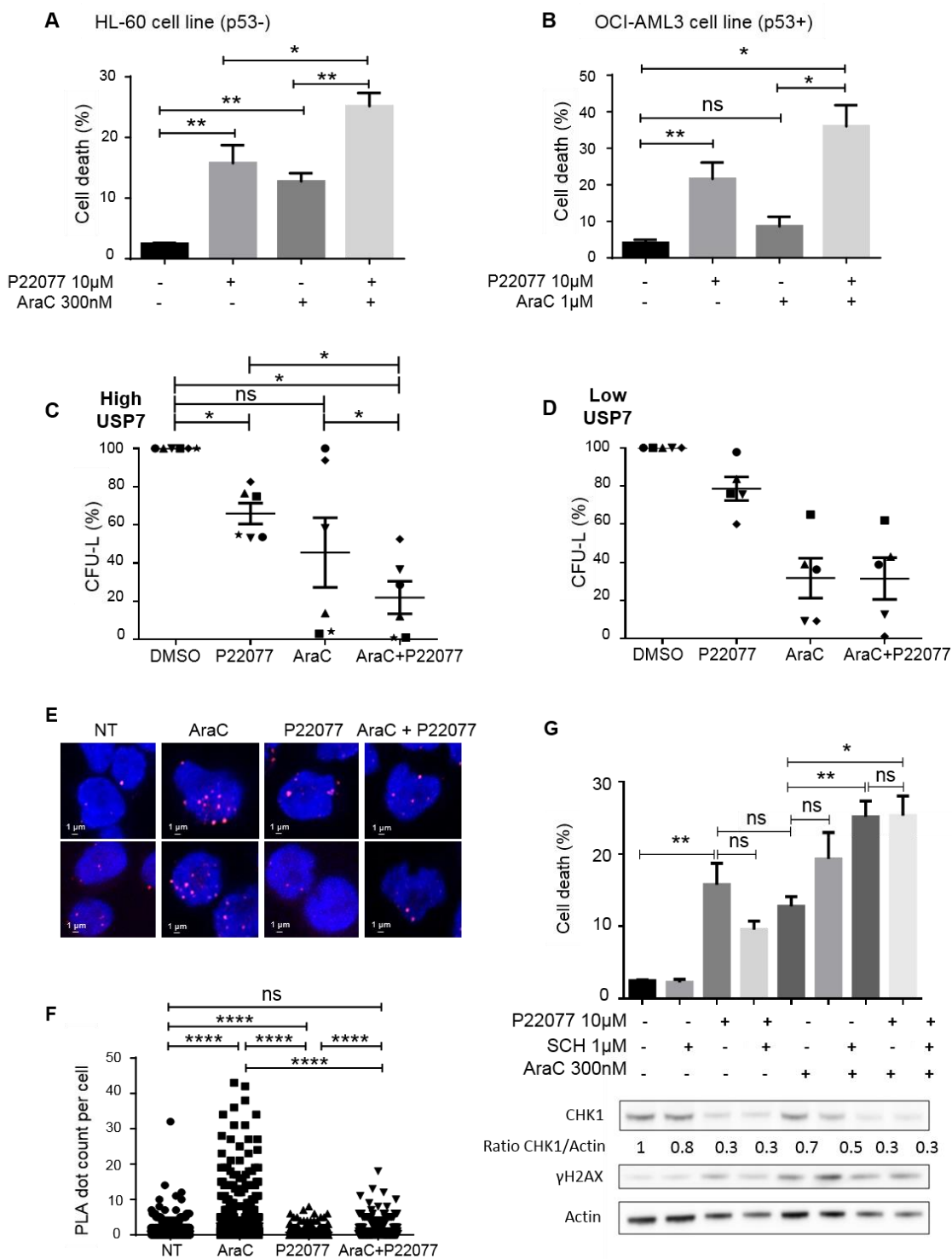
C-D: Analyses of the clonogenic properties of high USP7 abundance (n=6 primary samples, left panel) and low USP7 abundance (n=5 primary samples, right panel) AML blast cells upon continuous exposure to 10 nM cytarabine (Ara-C) alone or in combination with 5 μ M USP7 inhibitor (P22077). Colony formation was assessed after 7 days and represented as the ratio of the number of clones between untreated and treated conditions. For statistical analyses, an unpaired Wilcoxon test was used. * $P \leq 0.05$, and ns = not significant.

E: Proximity ligation assays were performed using anti-CHK1 and anti-USP7 antibodies in HL-60 cells treated with 10 μ M of P22077 and/or 300 nM of cytarabine for 16 h. DNA was counterstained with DAPI. Z-stack images were acquired by confocal microscopy.

F: Quantification of PLA foci from 3 independent experiments was performed with ZEN and ImageJ software. For co-staining of CHK1 and USP7: mean=1.07 \pm 0.07 foci/cell from 677 nuclei analyzed for the untreated condition (NT); mean=3.31 \pm 0.21 foci/cell from 743 nuclei analyzed for cytarabine treatment; mean=0.68 \pm 0.04 foci/cell from 604 nuclei analyzed for P22077 treatment and mean=1.24 \pm 0.10 foci/cell from 407 nuclei analyzed for combined treatment. *P*-values were determined using the unpaired *t*-test, $P < 0.0001$ ****.

G: HL-60 cells were treated with the indicated treatment for 24h. Cell death was assessed by flow cytometry with annexinV/cell viability staining using a MACSQuant VYB flow cytometer and FlowJo software. Statistical analysis was established by unpaired *t*-test (n=4). * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.01$. In parallel, cellular extracts were collected and expression of the indicated proteins was assessed by western blotting (below the graph). A representative western blot is presented, below ratios for CHK1 protein level normalized to actin loading control are indicated.

Figure 4



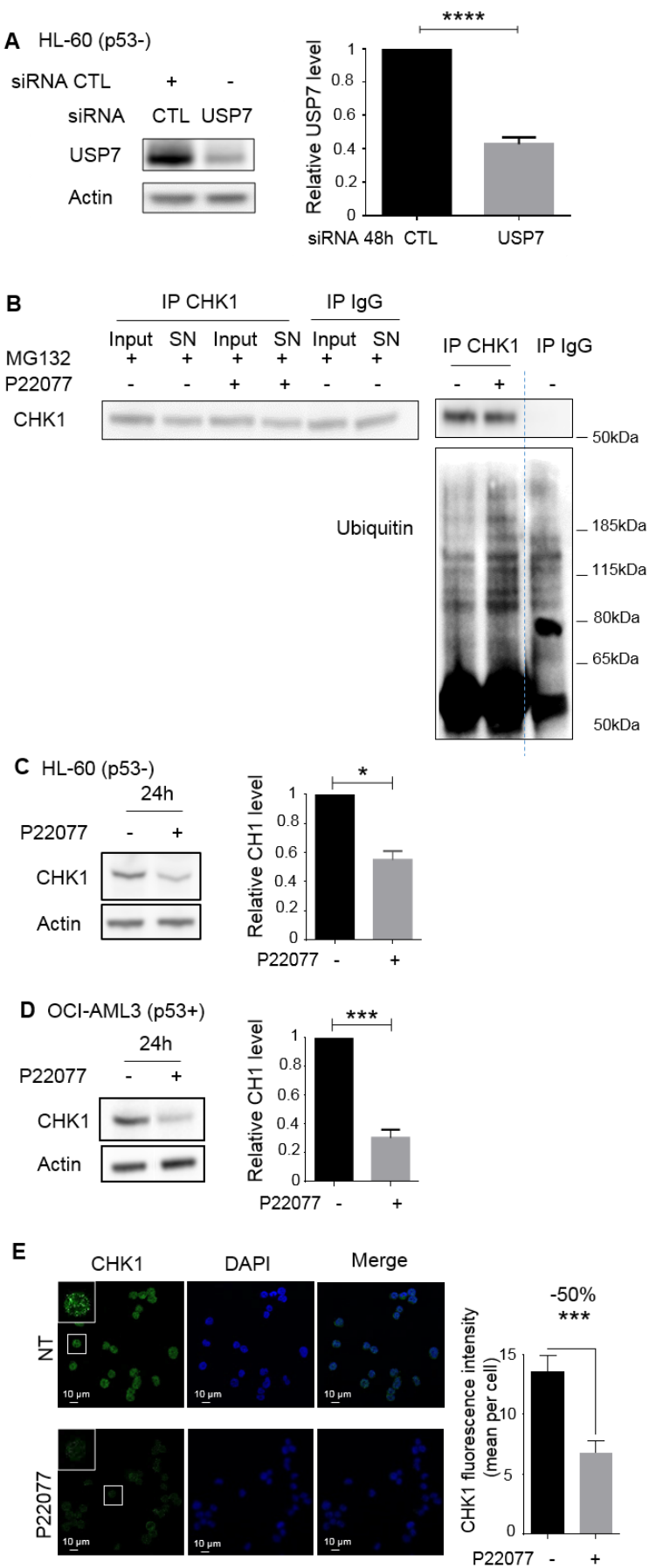
Supplemental informations

Supplementary Figures

fig. S1: Effect of USP7 Inhibition in Leukemic Cell Lines.

A: HL-60 cells were transfected with control (CTL) or USP7 siRNA and protein levels were analyzed 48 h later by western blotting with the indicated antibodies. Actin was used as the loading control. Normalization was performed using CTL siRNA conditions as the reference. Data show means \pm s.e.m. For statistical analyses, a nonparametric *t*-test was used. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (n=6). **B:** A CHK1 ubiquitination assay was performed in HL-60 cells. Cells were pre-treated with 10 μ M P22077 for 2 h and then 10 μ g/ml MG132 was then added to the medium for the final 6 h of incubation. Cellular extracts were immunoprecipitated with anti-CHK1 antibody or irrelevant Immunoglobulin (IgG) and then immunoblotted with the indicated antibodies. **C:** HL-60 cells were treated with the USP7 inhibitor (P22077) at 10 μ M during 24h, followed by western blotting for CHK1. For statistical analyses, a nonparametric *t*-test was used. * $P \leq 0.05$, (n=3). **D:** OCI-AML3 cells were treated with the USP7 inhibitor (P22077) at 10 μ M during 24h, followed by western blotting for CHK1 protein. For statistical analyses, a nonparametric *t*-test was used. *** $P \leq 0.001$, (n=5). **E:** Representative confocal images of immunofluorescent staining for α -CHK1 (green channel) in HL-60 cells untreated or treated with 10 μ M P22077 during 16h. DNA was counterstained with DAPI. Images were acquired by confocal microscopy. Scale bar, 10 μ m. The quantification of the mean CHK1 fluorescence intensity per cell is presented. Quantification of the images was performed with ZEN and ImageJ software to determine total CHK1 fluorescence intensity. 541 nuclei were quantified for the control condition (NT), and 444 nuclei for the P22077 treated condition were analyzed in 3 independent experiments. *P*-values were determined using the Mann-Whitney test. ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$.

Figure S1



A: USP7 protein levels were determined by immunoblot in 57 primary AML samples. Actin was used as loading control. KG1a cell line extract was used as internal control between gels (CTL). Some patient samples were not included (NI) in the analysis because of their quality (degradation). **B:** USP7 protein levels were determined by western blotting in different leukemic cell lines. Relative USP7 protein levels were normalized to actin loading control. The HL-60 leukemic cell line served as internal reference and was set to 1. **C:** Analysis for USP7 protein levels in primary leukemic cells used for single cell RNA sequencing analysis.

A

Western blot analysis of USP7 and Actin in 40 patient samples. The blots are arranged in four groups of 10 samples each. Each group shows USP7 and Actin bands. Actin bands are normalized to 1.0, and USP7 levels are indicated by relative intensity values.

Sample	USP7	Actin
#1	0.4	1.0
#2	0.4	1.0
#3	0.4	1.0
#4	0.4	1.0
#5	0.4	1.0
#6	0.4	1.0
#7	0.4	1.0
#8	0.4	1.0
#9	0.4	1.0
#10	0.4	1.0
CTL	0.4	1.0
#11	0.4	1.0
#12	0.4	1.0
#13	0.4	1.0
#14	0.4	1.0
#15	0.4	1.0
#16	0.4	1.0
#17	0.4	1.0
#18	0.4	1.0
#19	0.4	1.0
#20	0.4	1.0
CTL	0.4	1.0
#21	0.4	1.0
#22	0.4	1.0
#23	0.4	1.0
#24	0.4	1.0
#25	0.4	1.0
#26	0.4	1.0
#27	0.4	1.0
#28	0.4	1.0
#29	0.4	1.0
#30	0.4	1.0
CTL	0.4	1.0
#31	0.4	1.0
#32	0.4	1.0
#33	0.4	1.0
#34	0.4	1.0
#35	0.4	1.0
#36	0.4	1.0
#37	0.4	1.0
#38	0.4	1.0
#39	0.4	1.0
#40	0.4	1.0
CTL	0.4	1.0
#41	0.4	1.0
#42	0.4	1.0
#43	0.4	1.0
#44	0.4	1.0
#45	0.4	1.0
#46	0.4	1.0
#47	0.4	1.0
#48	0.4	1.0
#49	0.4	1.0
#50	0.4	1.0
CTL	0.4	1.0
#51	0.4	1.0
#52	0.4	1.0
#53	0.4	1.0
#54	0.4	1.0
#55	0.4	1.0
#56	0.4	1.0
#57	0.4	1.0
CTL	0.4	1.0

B

Western blot analysis of USP7 and Actin in five cell lines. The blots show USP7 and Actin bands. Actin bands are normalized to 1.0, and USP7 levels are indicated by relative intensity values.

Cell Line	USP7	Actin
HL-60	1	1
HEL	1	1
Molm-14	0.4	1
MV4-11	0.5	1
OCI-AML3	0.6	1
U937	0.4	1

C

Western blot analysis of USP7 and Actin in three patient samples. The blots show USP7 and Actin bands. Actin bands are normalized to 1.0, and USP7 levels are indicated by relative intensity values.

Patient samples	USP7	Actin
IM07	L	1
IM10	H	1
IM11	H	1

table 1: Up-Regulated Genes in USP7 Gene Signature.

USP7 gene signature (41 genes upregulated) was obtained from The Cancer Genome Atlas transcriptomic database.

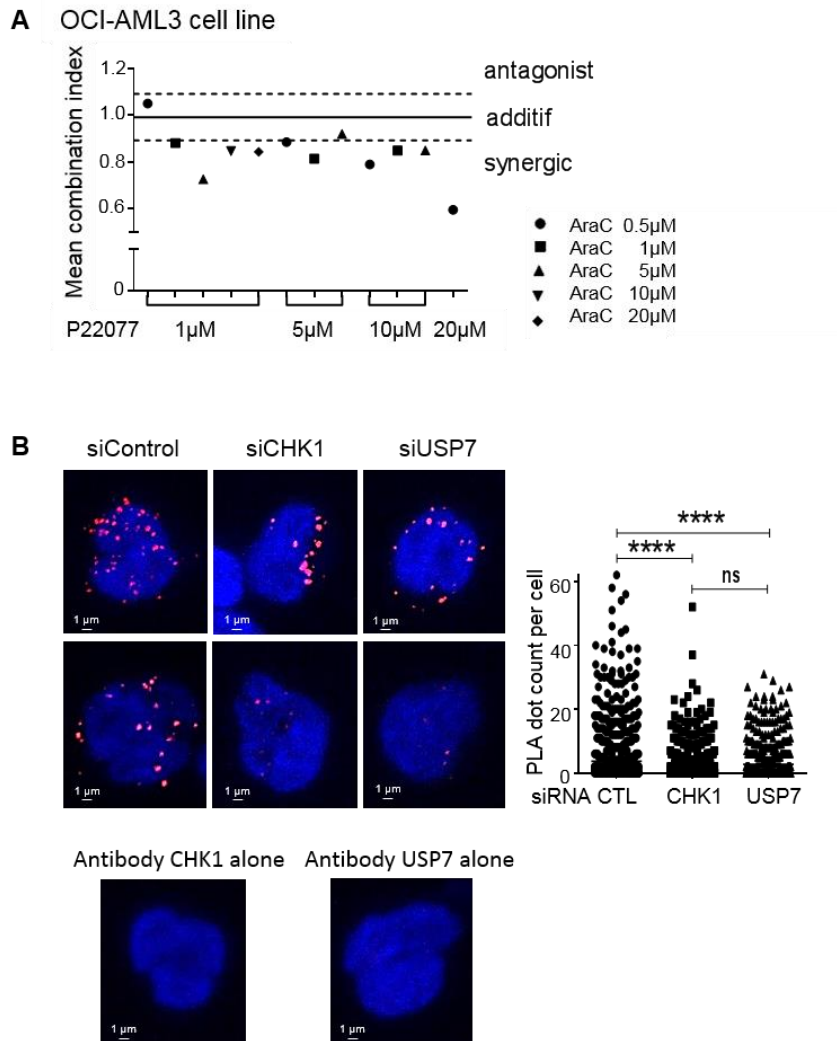
table S1

function	name	full name
Intracellular trafficking and organization	ANKRD9	ankyrin repeat domain 9
	MAP1A	microtubule associated protein 1A
	CLIC2	chloride intracellular channel 2
	ATP7B	ATPase copper transporting beta
	SCRN1	secernin 1
	ARL4C	ADP ribosylation factor like GTPase 4C
	C13orf18	RUN and cysteine rich domain containing beclin 1 interacting protein like
	SLC25A39	solute carrier family 25 member 39
	AQP3	aquaporin 3
	C6orf192	solute carrier family 18 member B1
Extracellular matrix organization	TGFB1	transforming growth factor beta induced
	CDH1	cadherin 1
	MMP2	matrix metalloproteinase 2
	LAMC1	laminin subunit gamma 1
	TNS1	tensin 1
Cell cycle and differentiation	HES6	hes family bHLH transcription factor 6
	PTPRS	protein tyrosine phosphatase, receptor type S
	RBM38	RNA binding motif protein 38
	BEX2	brain expressed X-linked 2
	UCHL1	ubiquitin C-terminal hydrolase L1
Immune system and response	CD6	CD6 molecule
	DARC	atypical chemokine receptor 1
	FCER1A	Fc fragment of IgE receptor 1a
	GATA3	GATA binding protein 3
Brain and neuronal system	PTGDS	prostaglandin D2 synthase
	BEX5	brain expressed X-linked 5
	TCF4	transcription factor 4
	NDN	necdin, MAGE family member
DNA binding	KIAA1598	shootin 1
	ZNF711	zinc finger protein 711
JAK/STAT	ZNF300	zinc finger protein 300
	PBX1	PBX homeobox 1
Notch pathway	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2
Ras pathway	DLK1	delta like non-canonical Notch ligand 1
Wnt pathway	TMEM158	transmembrane protein 158
Phosphatidate phosphatase activity	FZD3	frizzled class receptor 3
Glucogenesis	PPAPDC1A	phospholipid phosphatase 4
Angiogenesis	FBP1	fructose-bisphosphatase 1
Synthase activity	SERPINF1	serpin family F member 1
Unknown	HMBS	hydroxymethylbilane synthase
	FAM169A	family with sequence similarity 169 member A

fig. S3: USP7 Inhibition Synergizes Cytarabine Treatment in Leukemic Cells.

A: Using a combination of the indicated concentrations of P22077 and AraC treatment, the combination index was established with CompuSyn software. Graph represents mean combination index from 4 independent experiments. **B:** Validation of CHK1 and USP7 antibodies for Proximity ligation (PLA) assays. PLA tests were performed using CHK1 and USP7 antibodies on HL-60 cells transfected with the indicated siRNA for 48 h. DNA was counterstained with DAPI. Z-stack images were acquired by confocal microscopy. Scale bar, 1 μm . Quantification of foci per cell was performed with ZEN and ImageJ software and presented on right side. For co-staining of CHK1 and USP7: mean=3.75 \pm 0.22 foci/cell from 1180 nuclei analyzed under siRNA control conditions (n=4), mean=1.85 \pm 0.12 foci/cell from 1126 nuclei analyzed under siRNA CHK1 conditions (n=4), and mean=2.69 \pm 0.21 foci/cell from 650 nuclei analyzed under siRNA USP7 conditions (n=3). *P*-values were determined using the Mann-Whitney test, with **** $P\leq 0.0001$.

Figure S3



Supplementary Materials and Methods

Cell Lines, AML Samples and Treatments

Human leukemic cell lines HL-60, HEL, Molm14 and MV4-11 were cultured in RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). OCI-AML3 and U937 were cultured in MEMα medium with Glutamax. All media were supplemented with 20% fetal bovine serum, and cells were maintained at 37°C with 5% CO₂.

Immunoprecipitation

Cells were resuspended in a lysis buffer (20mM Trizma, 150mM NaCl, 5mM EGTA, 0.5% NP40, 1X protease inhibitor, 1X phosphatase inhibitor) and incubated on ice for 20 min. After centrifugation at 13200 rpm for 15min at 4°C, cell extracts were incubated with anti-CHK1 antibody (cat. no. DCS-310, Santa-Cruz) overnight at 4°C on a rotator. EZview Red Protein G

Affinity Gel (ref. E3403 Sigma) was added and incubated for 1h at 4°C on a rotator. Beads bound with immunoreactive complexes were washed three times with a cold lysis buffer. Immunoprecipitated complexes were boiled in a LBS sample buffer (Invitrogen) and a western blot experiment was performed as previously described.⁶

Ubiquitin Assay

HL-60 cells were treated with P22077 (10µM) over 8h, and treated with MG-132 at 10µg/ml (Enzo, BML-PI102-0005) for 6h. Immunoprecipitation of CHK1 was then performed as previously described.

Annexe 2 : Liste des 41 gènes formant la signature transcriptomique High USP7.

Signature USP7 faite à partir des données du TCGA

Fold change 1,6 = 41 gènes uprégulés corrélés à USP7

USP7 HIGH:

PBX1,PTGDS,ANKRD9,HES6,SERPINF1,SLC25A39,BEX5,ZNF711,RBM38,KIAA1598,TCF4,TN S1,NDN,HMBS,BEX2,C6orf192,CD6,PPAPDC1A,FAM169A,DLK1,SOCS2,FBP1,PTPRS,LAMC1, MAP1A,UCHL1,CLIC2,TGFBI,CDH1,ZNF300,ATP7B,MMP2,GATA3,SCRN1,ARL4C,DARC,C13 orf18,FCER1A,TMEM158,AQP3,FZD3